

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

Le Premier Congrès de l'Association des Microbiologistes de Langue Française avait eu lieu à Paris, en octobre 1938. L'année 1939 étant réservée au Congrès de l'Association Internationale des Microbiologistes, le II<sup>e</sup> Congrès de l'Association des Microbiologistes de Langue Française aurait dû avoir lieu en 1940. La ville de Bruxelles avait été choisie pour lieu de la réunion, que les événements, il est inutile de le rappeler, devaient rendre impossible.

Dès le retour à l'état de choses normal, le Bureau de l'Association des Microbiologistes de Langue Française s'est efforcé de renouer les liens de l'Association, et les contacts ont été repris entre la Société Française de Microbiologie et les branches ou membres isolés de l'Association vivant ou travaillant hors de France. Au IV<sup>e</sup> Congrès de l'Association Internationale des Microbiologistes, tenu à Copenhague en 1947, une réunion du Bureau avait pu fixer à 1949 la date du II<sup>e</sup> Congrès de l'Association des Microbiologistes de Langue Française ; l'hospitalité que nous offraient généreusement les membres de la section belge permettait de maintenir le choix primitif de Bruxelles pour siège de la réunion.

Au même Congrès de Copenhague, une réunion de l'Union Internationale des Sciences Biologiques (I. U. B. S.) désignait la France pour organiser un symposium international en vue d'étudier en commun le rôle des anaérobies dans la nature.

Partant de ces données, il a paru opportun de réunir les deux manifestations, ce qui fut fait à la suite d'une entente entre l'Union Internationale des Sciences Biologiques et les Bureaux

de l'Association des Microbiologistes de Langue Française et de la Société Française de Microbiologie.

C'est dans ces conditions que le II<sup>e</sup> Congrès de l'Association des Microbiologistes de Langue Française, qui s'est tenu à Bruxelles du 23 au 27 mai, a été consacré à un *Symposium sur le rôle des anaérobies dans la nature* réunissant une participation internationale dépassant le cadre de la microbiologie de langue française. Par la qualité de ses participants et l'intérêt des réunions, le Symposium a remporté le plus vif succès. A la suite d'un accord intervenu entre l'Union Internationale des Sciences Biologiques et la Société Française de Microbiologie, la rédaction des *Annales* est heureuse de pouvoir présenter à ses lecteurs, réunis en un numéro spécial dont un tirage sera adressé à chacun des participants du Congrès de Bruxelles, les rapports qui ont été présentés au cours de cette manifestation. Nous sommes convaincus que les lecteurs des *Annales* apprécieront cette initiative, qui permet de leur offrir un ensemble de travaux sur les anaérobies d'un actuel intérêt et d'une rare qualité.

LA RÉDACTION.

## ROLE DES ANAÉROBIES EN AGRONOMIE

par R. E. BUCHANAN.

(*Iowa State College, Ames, Iowa.*)

Le « Rôle des anaérobies en agronomie » est un sujet particulièrement propre à être discuté devant les membres de la Société Française de Microbiologie et du Second Congrès International des Microbiologistes de Langue Française. Ce fut Pasteur qui bouleversa le monde scientifique par la preuve que certains microbes peuvent croître et se reproduire en l'absence d'air. A peine nous rendons-nous compte aujourd'hui de la signification complètement révolutionnaire de cette déclaration. Elle équivalait, dans son temps, à l'exposé des principes sur lesquels est basée la bombe atomique de nos jours. Beaucoup des travaux dominants dans le domaine des recherches anaérobiques ont été publiés en langue française. Il serait trop long de mentionner tous les auteurs qui ont travaillé la question, mais on doit souligner la haute position occupée par l'Institut Pasteur de Paris grâce aux contributions de M. Weinberg et ses collaborateurs, et de notre collègue M. Prévot. La langue française a servi à exprimer une grande partie de nos progrès dans la connaissance des organismes anaérobies, de leur métabolisme et de leur signification économique.

Un mot seulement à propos de la nomenclature et de la classification. Pasteur, ce géant de la recherche dans le domaine de la physiologie microbienne, caractérisait par des détails biochimiques les organismes avec lesquels il travaillait, mais, en général, il employait des noms communs pour les désigner. Il évitait de donner des noms scientifiques. Cependant, il ne faudrait pas interpréter ce fait (comme on l'a fait quelquefois) comme une aversion de sa part contre leur usage. Rappelez-vous le plaisir évident avec lequel il adopta et utilisa les noms scientifiques de certaines levures qui lui furent données par l'école danoise sous la direction de Hansen. Pendant de nombreuses années, il n'y eut pas de travaux français importants au point de vue taxonomie bactérienne ; il nous a semblé, dans les autres pays, que les microbiologistes devaient éprouver un sentiment presque sacrilège à l'emploi de noms autres que les noms communs, ceux de Pasteur, et cela malgré le fait que beaucoup de contributions importantes à la taxonomie botanique et zoologique nous parve-

naient par le truchement de la langue française. Les choses ont changé au cours de ces dernières années. Les contributions apportées par des hommes tels que Hauduroy et Brumpt ont tracé la voie. Les séries d'articles de Prévot, et surtout son « Manuel de classification des bactéries anaérobies », publié comme « Monographie de l'Institut Pasteur », ont été d'une grande importance. Ici, nous avons pris grand soin d'intégrer les résultats de cet auteur et de ses collègues dans les études faites dans d'autres pays et dans l'œuvre du Comité International de Nomenclature bactériologique, dont il est membre. Des soins particuliers ont été pris pour établir des diagnostics appropriés de genre et de groupe supérieur, pour différencier et désigner les espèces par des noms en accord avec les règles de la nomenclature bactériologique.

Il faut définir convenablement le sujet assigné ; je ne puis abuser de votre temps en parlant de sujets qui pourraient être interprétés comme agronomiques, mais qui certainement couvriraient en partie les présentations d'autres orateurs. Le thème général du Symposium qui me fut primitivement donné était : « Le rôle des anaérobies stricts dans la nature ». Ce titre a été modifié ainsi dans le programme officiel : « Le rôle des bactéries anaérobies dans la nature ».

Je propose que notre discussion soit limitée par la définition du terme « anaérobie strict », c'est-à-dire un organisme qui non seulement n'a pas besoin d'oxygène libre mais qui est, de plus, nettement inhibé par sa présence. Comme bactérie strictement anaérobie, on désigne celle pour laquelle l'oxygène libre est nettement toxique. Cependant la nature offre beaucoup d'exemples dans lesquels des anaérobies stricts peuvent se développer en présence d'oxygène, pourvu que certains autres micro-organismes, certains enzymes ou certains composés chimiques soient présents. Il me semble logique de limiter notre discussion aux milieux qui permettent la croissance des anaérobies stricts ainsi définis. Mais nous ne pouvons ignorer le fait que, croissant dans ces milieux, il y a beaucoup d'anaérobies facultatifs qui sont capables de produire les mêmes transformations que les anaérobies stricts. En d'autres termes, en discutant le rôle des anaérobies stricts en agriculture, nous ne pouvons ignorer le rôle des anaérobies facultatifs.

Et que doit-on entendre par le terme « en agronomie » ? Il semble qu'on puisse l'employer dans un sens large ou étroit ; il peut être restreint à une considération de récolte, de sol et de champs, ou bien plus largement, il peut comprendre toutes les activités de l'agriculture, c'est-à-dire aussi l'élevage des animaux. En outre, pendant les dernières années, les intérêts du fermier se sont étendus au delà du sol, de la récolte, des animaux domes-

tiques et de la volaille et, au delà des forêts, à la conservation et à la distribution des produits animaux et végétaux au consommateur. Je vais interpréter le terme « agronomie » dans ce sens large et compréhensif.

Quels sont donc les rôles majeurs joués par les bactéries anaérobies en agronomie ? Il semble qu'ils puissent se ranger sous cinq ou six rubriques : les changements produits dans le sol et les engrains, fumier inclus ; les changements qui se font dans les résidus de ferme après leur évacuation, spécialement les ordures ménagères et immondices des égouts ; les changements produits lors de la digestion de la nourriture dans l'intestin des animaux domestiques et de la volaille ; le rôle des anaérobies dans la production de maladies du bétail et de la volaille ; les changements causés aux différents aliments humains ou animaux au cours de leur fabrication, conservation et détérioration, et leur utilisation dans la fabrication de certains produits industriels, surtout de nature chimique.

Ces activités peuvent être schématisées comme suit :

Rôle des bactéries anaérobies en agronomie.

1. Dans le sol :

- a) Engrais et fumiers ;
- b) Décomposition de matière organique.
  - (1) Cellulolytique ;
  - (2) Protéolytique : nitrification ;
  - (3) Fixation d'azote ;
  - (4) Rapports particuliers avec nitrates, sulfates ;
  - (5) Méthane et  $\text{CO}_2$ .

2. Dans l'évacuation des résidus. Fosses septiques.

3. Dans la digestion et alimentation du bétail et de la volaille :

- a) Ruminants :
- b) Autres herbivores ;
- c) Autres animaux.

4. Dans les maladies des animaux domestiques.

5. Dans la fabrication et conservation de produits agricoles :

- a) Aliments.
  - (1) Fermentations pour la conservation de la nourriture humaine et animale (fourrage, etc.).
  - (2) Détérioration de nourritures et aliments réfrigérés, séchés, préservés chimiquement ou par la chaleur.
  - (3) Fermentations particulières pour la préparation d'aliments (cacao, café, vanille, etc.).
- b) Fibres.
  - (1) Rouissage.
  - (2) Détérioration.

6. Dans la fabrication de produits chimiques :

Fermentation acétonique, butyrique et butylique.

Nous avons déjà insisté sur le fait qu'une étude des anaérobies en agronomie nécessite l'abandon partiel de la distinction existant entre anaérobies stricts et facultatifs. Il conviendrait peut-être de clarifier un peu notre terminologie en énumérant les quelques groupes de bactéries qui peuvent, au moins en théorie, être différenciés sur la base de leur relation avec l'oxygène libre. Les bactéries peuvent être arbitrairement classées comme suit :

1° Les bactéries qui ont besoin d'oxygène moléculaire pour leur croissance sur tous les substrats. L'oxygène moléculaire est nécessaire au métabolisme normal des cellules et à leur multiplication probablement comme accepteur final d'hydrogène. De tels organismes peuvent à juste titre être dénommés aérobies obligatoires.

2° Les bactéries qui utilisent l'oxygène moléculaire, comme celles du groupe précédent, mais qui peuvent vivre et se développer dans des conditions anaérobies, pourvu que soit présent un accepteur d'hydrogène adéquat, comme par exemple nitrate, sulfate ou hydrate de carbone. Ces organismes constituent un des groupes facultatifs.

3° Les bactéries qui peuvent se développer en présence comme en absence d'oxygène libre, mais qui l'utilisent (si disponible) mal ou pas du tout. Leur métabolisme et leurs produits de croissance sont peu influencés par sa présence. Ces organismes constituent un second groupe facultatif.

4° Les bactéries qui n'ont pas besoin d'oxygène libre, qui forment au contraire des produits toxiques en sa présence, mais qui produisent une catalase ou autres peroxydases neutralisant ces composés toxiques.

5° Les bactéries qui ne poussent normalement que dans des conditions strictement anaérobies, c'est-à-dire qui ne poussent pas sur les milieux usuels en présence d'oxygène moléculaire. L'oxygène moléculaire est pour elles relativement toxique. Il semble que cette toxicité résulte de composés intermédiaires formés par la cellule, tels que peroxyde d'hydrogène ou autres peroxydes. Dans de tels cas, la présence d'une catalase ou d'une autre peroxydase appropriée, introduite dans le milieu ou sécrétée par d'autres organismes présents, permettra la croissance, même en présence d'air. De plus, l'ajustement du milieu à un potentiel d'oxydo-réduction convenable rendra également possible leur croissance en présence d'air. Probablement beaucoup, sinon la plupart, des anaérobies stricts appartiennent à ce groupe.

6° La question de savoir si oui ou non il existe un sixième groupe pour lequel l'oxygène est toxique, quelles que soient les conditions environnantes, n'a pas été tranchée de façon décisive. Il est fort possible qu'il y en ait un.

Revenons maintenant au sujet assigné, le rôle des anaérobies en agronomie. Quand on examine le titre des articles qui seront lus à ce Symposium, il est évident que la plupart d'entre eux sont en rapport, au moins en partie, avec le rôle des micro-organismes en agriculture. C'est pourquoi je m'abstiendrai de m'étendre sur les sujets dont on parlera plus tard et m'efforceraïs surtout de combler les vides entre ces différents sujets.

Combien reconnaît-on d'anaérobies stricts comme ayant une signification en agronomie ? Dans l'énumération ci-dessous j'ai omis les anaérobies associés aux maladies des animaux comme ne devant pas figurer dans une liste d'espèces agronomiques. La discussion la plus complète sur les bactéries anaérobies est celle de notre collègue M. Prévot (1940). Dans son Manuel, il reconnaît que les anaérobies sont compris dans trois classes de bactéries, subdivisées en 13 familles avec 38 genres, renfermant chacun une à plusieurs espèces d'anaérobies stricts. La plupart d'entre eux sont automatiquement exclus de notre discussion, car ils se rangent dans la catégorie de la bactériologie médicale plutôt qu'agricole. Quant aux différents genres et espèces catalogués, le tableau suivant montre ceux qui peuvent être considérés comme jouant un rôle en agronomie :

*Sarcina*, 3 sp. ; *Ristella*, 2 sp. ; *Zuberella*, 1 sp. ; *Eubacterium*, 3 sp. ; *Paraplectrum*, 1 sp. ; *Endosporus*, 10 sp. ; *Inflabibilis*, 8 sp. ; *Welchia*, 1 sp. ; *Clostridium*, 27 sp. ; *Terminosporus*, 4 sp. ; *Caduceus*, 6 sp. ; *Plectridium*, 12 sp. ; *Acuformis*, 6 sp. et *Sporovibrio*, 2 sp., un total d'au moins 87 espèces. Cette liste pourrait être facilement allongée par une revue des nombreux anaérobies présentés dans l'édition VI du *Manual of Determinative Bacteriology*, de Bergey (1948).

Où trouve-t-on ces organismes ? Leur large distribution et leur signification peuvent être facilement reconnues par la lecture de la revue encyclopédique des bactéries anaérobies publiée en 1937 par Weinberg, Nativelle et Prévot. Spécialement utile est la classification donnée sous le titre « Habitat des anaérobies ». Le nombre des espèces énumérées pour certains habitats est le suivant : Sol 43, Eaux douces 2, Eaux de mer 12, Eaux résiduelles de tannerie 1, Fumier 15, Poussière 2, Plantes 7, Fruits et Légumes 2, Paille et Textiles 8, Bois mort 3, Cadavres 7, Puits de pétrole 2, Viande 16, Jambon 3, Poisson fumé 1, Lait de vache 4, Fromage 4, Conserves 7, Bière 1, Pâte de farine 1.

Malheureusement, notre revue du rôle des anaérobies en agriculture (comme dans la nature en général) sera quelque peu entravée par la classification et systématisation qui sont encore actuellement tout à fait inadéquates. Je pense néanmoins que nous pouvons passer maintenant à une revue plus détaillée du rôle des anaérobies en agriculture.

Les bactéries anaérobies participent à nombre de changements fonctionnels qui se passent dans le sol et dans les engrais et fumiers préparés pour augmenter sa fertilité. Elles décomposent la matière organique du sol et des fumiers, avec dégagement de gaz, diminuant ainsi le total de matière organique présente. Elles refont de la matière organique (en modifiant par exemple le rapport carbone/azote). Elles changent, en particulier, le caractère des composés dans lesquels existe de l'azote organique. Elles modifient aussi le rapport carbone/oxygène des composés restants. La nature de certains composés inorganiques du sol peut être modifiée par réduction ou par utilisation des nitrates et sulfates.

La cellulose entre dans la composition du sol des champs cultivés, souvent en quantité énorme. Sa décomposition en partie sous l'action des anaérobies du sol a une très grande importance. Il n'est cependant pas nécessaire de discuter ce problème ici, puisque M. Pochon présentera plus tard le sujet des « Anaérobies cellulolytiques ».

Depuis les premiers travaux de Winogradsky sur le pouvoir de certaines bactéries anaérobies de fixer et d'utiliser l'azote atmosphérique, on s'est efforcé de déterminer de façon satisfaisante leur rôle dans la conservation ou l'augmentation de la fertilité du sol. Ce problème agronomique sera envisagé par M. Thaysen. Je me réfère à lui, mais je tiens à faire remarquer qu'une étude approfondie de ce phénomène n'a pas encore été faite, malgré les nombreux instruments et techniques nouvelles dont nous disposons actuellement. Protéolyse, nitrification et synthèse des composés azotés, en rapport avec la fertilité du sol, ont aussi grand besoin de plus de recherches. Miss Meiklejohn fera une revue des problèmes de la réduction des nitrates en nitrites en anaérobiose. Ces transformations ont aussi leurs applications agronomiques.

Très apparenté à la signification économique des changements anaérobiques se produisant dans le sol, est le rôle des anaérobies dans le traitement sanitaire des déchets, particulièrement des ordures ménagères. L'usage de la fosse septique pour l'évacuation des ordures de la ferme devient rapidement, au moins en Amérique, une mesure habituelle. Les déchets sont évacués par eau vers une citerne souterraine où se produit une fermentation anaérobie vigoureuse, généralement avec dégagement d'une grande quantité de méthane et d'autres gaz. Les fosses septiques sont de taille à contenir les ordures ménagères d'environ deux jours. La digestion de la matière organique est remarquablement complète et rapide, il ne reste que relativement peu de matière organique non décomposée. Si l'on dispose d'un sol raisonnablement perméable, la matière effluente est conduite sur des tuiles de glaise non vitrifiée, où elle dégouttera peu à peu. Quelquefois,

il est nécessaire d'installer un filtre de sable couvert pour oxyder complètement les composés organiques restants, de sorte que l'effluent final puisse être déversé sans danger dans les fleuves.

Occasionnellement, on rencontre des difficultés pratiques en rapport avec les activités de certains anaérobies. Dans certains cas, l'eau ménagère peut être riche en sulfates, et alors la réduction anaérobique du sulfate en sulfure d'hydrogène peut être tellement rapide qu'elle donnera des ennuis du point de vue odeur. Généralement, ces citerne sont construites en béton. Le chapeau que fait le liquide dans la fosse septique est constitué d'habitude par une écume épaisse et flottante qui se forme à la surface. Au-dessus de la ligne de flottaison, le sulfure d'hydrogène peut être adsorbé sur les surfaces mouillées du béton en contact avec l'air. Il en résulte la croissance de bactéries aérobies oxydant le sulfure avec production d'acide sulfurique en concentration suffisante pour provoquer la désagrégation et l'usure du béton. L'expérience a aussi enseigné au fermier que certains types de sol contiennent des sulfates et que les tuyaux de drainage en béton s'y détériorent rapidement. Dans les sols humides et contenant de la matière organique, les sulfates sont réduits en sulfures et parviennent par l'eau effluente aux tuyaux de drainage où ils sont réoxydés en acide sulfurique qui attaque ces tuyaux.

Le gaz produit dans une fosse septique est combustible, constitué en grande partie de méthane. On a cherché à augmenter cette production de gaz de façon à pouvoir l'utiliser comme combustible pour la cuisine et la cuisson. Des installations expérimentales ont montré qu'il est possible de construire des fosses septiques suffisamment grandes pour y introduire de façon constante des matières cellulosiques telles que foin, tiges de maïs, bagasses de canne à sucre, tiges de chanvre ou matériaux semblables, coupés en morceaux et de produire ainsi du gaz en quantité utilisable. Cependant, l'économie de ce procédé, comparée à l'usage de propane, butane ou pétrole, n'a pas été démontrée, tout au moins aux Etats-Unis. Naturellement, il faut veiller à assurer un apport bien équilibré d'azote pour obtenir les résultats optimum.

L'agriculture tire aussi profit d'une autre activité des micro-organismes anaérobies, celle de la digestion, spécialement de la digestion de certains hydrates de carbone. Nous savons que les animaux herbivores, beaucoup d'insectes et certains mollusques mangent et digèrent des aliments riches en cellulose. A l'exception de quelques animaux comme le limaçon, aucun d'eux n'est connu comme produisant dans son tube digestif des enzymes capables d'hydrolyser la cellulose. Les ruminants sont spécialement remarquables car ils consomment et utilisent la cellulose malgré l'absence complète d'aucun enzyme attaquant cette subs-

tance. Beaucoup de travaux ont été consacrés à l'étude de ce problème. La morphologie du tube digestif du ruminant est très différente de celle des animaux carnivores ou omnivores, même de celle des autres animaux herbivores, comme par exemple le cheval. Vous savez que le ruminant ne possède pas un estomac unique mais toute une série d'organes beaucoup plus compliqués que l'estomac relativement simple d'un animal omnivore comme le porc. Ce qui nous intéresse ici plus particulièrement est le premier de ces estomacs ou compartiments, le « rumen » ou panse. C'est le prototype d'une chambre de fermentation, et c'est bien là son utilité. Chez la vache il est étonnamment spacieux, il peut avoir une capacité de 40 à 50 gallons, soit 180 à 225 litres. La nourriture, après mastication partielle, passe dans la panse qui, normalement, est en partie remplie de fourrage mâché et partiellement digéré, immergé dans du liquide. Cette masse mi-solide, mi-liquide subit une fermentation rapide et l'espace la surmontant se remplit des produits gazeux de cette fermentation, surtout de méthane. De temps en temps, des portions de nourriture, entraînées par des gaz en excès, sont régurgitées, mâchées à nouveau, mêlées de salive et avalées. Il se produit aussi un écoulement constant et abondant de salive vers la panse, environ 40 litres par jour ou plus. Cette salive ne contient pratiquement pas d'enzymes ; elle est essentiellement une solution diluée de carbonate de soude qui apparemment maintient le pH du contenu de la panse à un niveau satisfaisant pour les processus digestifs.

Il y a cent six ans, en 1843, deux chercheurs français, Gruby et Delafond, ont publié un ouvrage classique sur les animalcules qu'on rencontre dans le tube digestif des animaux, particulièrement des herbivores. Ils ont réalisé ce qui fut apparemment la première contribution de valeur à notre connaissance à la physiologie et aux fonctions de la panse. C'étaient en vérité des observateurs précis. Voici quelques-unes de leurs conclusions :

« Le très grand nombre de ces animalcules dans les deux premiers estomacs des ruminants, la présence de leurs carapaces vides dans le troisième, dans le quatrième et dans les matières excrémentielles... nous portent à conclure que la matière organique de ces animalcules est digérée dans la caillette des ruminants ».

Le développement de nos connaissances à ce sujet n'a pas été beaucoup plus qu'une vérification complète de leurs conclusions.

La panse est évidemment une vaste chambre biologique de fermentation, minutieusement réglée quant à l'humidité, aux entrées et sorties des matières à fermenter, au maintien d'une concentration favorable des ions H et aux conditions strictement anaérobies. Nous nous attendions certainement à ce qu'une fer-

mentation qui entraîne la production de méthane soit essentiellement anaérobie. Ce gaz est produit rapidement et en quantité considérable. Turner (1945) déclare qu'une vache peut produire de 60 à 100 litres de gaz pendant cinq à six heures après avoir mangé. Cela veut dire qu'une vache peut produire plusieurs centaines de litres de méthane par jour (à la pression atmosphérique). soit environ 150 g., c'est-à-dire une quantité considérable.

Nous savons que ce méthane résulte de la fermentation anaérobie de la cellulose et des autres hydrates de carbone présents dans la nourriture. Il reste encore un champ d'étude très attristant quant aux types d'organismes qui provoquent cette transformation. Beaucoup de faits intéressants ont été récemment ajoutés par l'œuvre de Kaars Sypesteyn en Hollande. Il a décrit plusieurs espèces nouvelles de bactéries anaérobies non sporulées qui appartiennent à deux genres nouveaux, *Ruminococcus* et *Ruminobacter*. Ces derniers, pense-t-il, sont les principaux agents de la transformation et de la digestion de la cellulose.

Probablement la personne la mieux qualifiée pour interpréter le mécanisme de cette fermentation méthanique sera M. Barker, qui discutera au cours de ce programme le « Métabolisme des gaz chez les anaérobies ». Nous nous référerons à lui pour une analyse de ce cas extrême d'oxydation et réduction simultanées. Si nous acceptons la conclusion que la fermentation méthanique de la panse n'est pas différente des autres fermentations méthaniques, il s'ensuit que le méthane doit être formé par la transformation pratiquement complète de l'anhydride carbonique ou des carbonates produits dans la panse. Il est intéressant de noter que le carbonate de soude apporté journallement par la salive dans la panse pèse à peu près un tiers de kilogramme, et que son  $\text{CO}_2$  transformé en méthane, donnerait environ 90 litres de ce gaz, une partie considérable de la quantité quotidienne produite par la vache. Le reste du méthane, bien entendu, doit provenir du contenu de la panse. Barker a reconnu l'existence d'au moins 3 genres de bactéries méthaniques, ce sont : *Methanosarcina*, *Methanococcus* et *Methanobacterium*.

Si intéressante que puisse être la production de méthane, ce n'est pas le seul changement qui rende assimilable la cellulose de la nourriture chez le ruminant. Il semble évident que la cellulose peut être attaquée au moins de deux façons. Certaines bactéries, sous anaérobiose constante, transforment une partie de la cellulose en acides organiques, lactique et acétique inclus. Ces acides ou leurs sels sont absorbés dans le sang et utilisés dans le corps de l'animal. On a de sérieuses raisons de croire que les ruminants, contrairement à beaucoup d'autres groupes d'animaux, font rarement usage direct de sucres, mais utilisent à leur place des acides organiques produits dans la panse.

Le nombre des bactéries de la panse est énorme. L'examen microscopique nous en montre une quantité beaucoup plus grande que celle qu'on a pu jusqu'à présent obtenir en culture. Ces bactéries, évidemment, n'attaquent pas seulement les hydrates de carbone, mais aussi les protéines. Leur activité digestive amène la transformation d'une partie du carbone et de l'azote en protoplasme bactérien et en structures cellulaires. Il apparaît que ces bactéries peuvent subir trois sorts différents. Une partie reste dans la panse pour infecter la nourriture ingérée, pour se multiplier et produire les modifications fermentaires essentielles. Une autre partie est emportée vers les autres estomacs où elle est digérée et utilisée comme aliment. A la Station expérimentale d'Agriculture de l'Illinois, Johnson, Hamilton, Mitchell et Robinson (1942) ont recueilli le contenu de la panse par filtration, centrifugation différentielle et lavage. Après séchage, ils ont ainsi obtenu environ 80 g. de cellules bactériennes qui se montrèrent, à l'essai, une nourriture protéique de haute valeur.

Une autre partie de ces bactéries, enfin, est absorbée et assimilée par de nombreuses cellules protozoaires, appartenant généralement à quelque 20 ou 30 espèces de Ciliés. Nous en reparlerons plus loin.

Ces bactéries de la panse remplissent encore une autre fonction. On admet généralement que les animaux ont besoin, dans leur régime, d'un minimum de certains acides aminés et qu'ils sont incapables de faire la synthèse de ces composés indispensables à partir de corps simples, tels que des sels d'ammonium comme source d'azote. Cependant, des composés azotés simples, comme par exemple l'urée, peuvent remplacer, en partie, les protéines de l'alimentation. Apparemment, la flore de la panse est capable de transformer ces substances azotées simples en composés pouvant être utilisés par l'animal. Le ruminant, pas plus que l'homme, n'a le pouvoir inné de synthétiser ces composés indispensables, mais la flore de la panse les leur fournit sous forme utilisable.

Ces bactéries de la panse contribuent aussi à la santé de leur hôte d'une autre manière. On sait, depuis longtemps, que le ruminant est relativement peu sensible à l'absence dans sa nourriture de certaines vitamines ordinairement considérées comme essentielles pour la santé. Il apparaît de plus en plus que certains micro-organismes présents dans le tube digestif peuvent faire la synthèse des vitamines nécessaires. En fait, ils semblent même les produire en excès des besoins de leur hôte, car les fèces sont beaucoup plus riches en ces vitamines que ne l'était le fourrage ingéré. Les résultats acquis aux Stations expérimentales d'Agriculture du Wisconsin et de l'Illinois ont montré une corrélation positive entre la nature de la nourriture ingérée par la vache et

la quantité et le genre des vitamines produites dans la panse. Par exemple, le maïs stimule la production de riboflavine tandis que l'urée ou le sucre augmentent la production de niacine, riboflavine, acide pantothénique et biotine. En fait, l'augmentation de la teneur en vitamines de la panse de la vache après l'ingestion de nourriture est telle qu'elle permet d'utiliser le contenu de la panse, recueilli à l'abattoir, comme source de vitamines pour l'alimentation de la volaille.

Les bactéries de la panse sont-elles essentielles à la vie du ruminant ? Certainement, elles le sont. En même temps évidemment que s'est faite l'évolution au cours des siècles du grand groupe animal, les *Ruminentia*, il y eut formation d'une chambre d'incubation anaérobie permettant le développement des bactéries essentielles et l'adaptation subséquente des bactéries symbiotiques nécessaires.

Normalement, les protozoaires constituent un des autres composants microbiens anaérobies du contenu de la panse. Ces animacules ont été depuis longtemps l'objet d'études attentives ; ils sont parmi les plus grands et les plus complexes des Ciliés. Plus d'une centaine d'espèces contenues dans la panse ont été décrites. Beaucoup d'entre elles ont un tube digestif bien développé. Sans conteste, certaines ingèrent et digèrent la cellulose. Probablement toutes se nourrissent des bactéries avoisinantes qui constituent probablement une grande partie de la ration alimentaire des Ciliés. Ces protozoaires sont beaucoup plus grands que les bactéries, certains jusqu'à cent cinquante mille fois. Ils constituent une partie appréciable de la matière solide que renferme le liquide s'écoulant constamment de la panse aux autres portions du tube digestif, où (comme on l'a constaté, il y a de cela plus de cent ans) ils sont digérés. Apparemment, la vache digère plusieurs kilogrammes par jour de protéine de protozoaire (animale). On a constaté que les protozoaires séchés contiennent environ 44 p. 100 de protéine. Des études utilisant les techniques de défaunation ont montré que les ruminants peuvent survivre et même se développer normalement en absence des protozoaires caractéristiques. Ils jouent apparemment un rôle important, mais non essentiel, dans les processus digestifs de la panse. Les bactéries anaérobies, elles, ont indispensables.

Ce qui se passe chez les herbivores non ruminants n'est pas si bien connu, mais on en sait assez pour conclure que chez eux aussi les bactéries ont un rôle important dans la digestion. Serait-ce trop de dire que le rôle de ces bactéries dans la digestion du fourrage est peut-être le plus important de ceux joués par les anaérobies en agriculture ? Ce champ particulier dans le domaine de l'anaérobiose n'a été jusqu'à présent que très insuffisamment exploré. L'œuvre de Hungate (Texas) sur la culture de ces pro-

tozoaires devrait être étendue. Nous pouvons déclarer, comme le fait M. Turner (Missouri) dans son rapport :

« Les différences fondamentales entre l'alimentation des animaux à estomac simple et celle des animaux ruminants sont tellement grandes qu'il faut créer une science absolument nouvelle, celle de l'alimentation des ruminants. Les problèmes de cette science nouvelle ne concerteront pas en premier lieu l'alimentation de la vache elle-même, mais surtout le développement rapide des organismes de la panse et la production de protéine microbienne de valeur. »

D'après le titre du programme : « Le rôle des bactéries anaérobies dans la nature », et les titres des thèses qui seront présentées, les problèmes de bactériologie anaérobie humaine et vétérinaire ne seront pas discutés. Il faut noter en passant que les pertes en bétail causées par des maladies à bactéries anaérobies peuvent être importantes. Elles vont de l'incapacité des ruminants à éliminer sous certaines conditions le gaz de la panse et le ballonnement consécutifs à toute la gamme de maladies, telles que télos, œdème malin, botulisme et autres.

Notre première définition d'agronomie a été suffisamment large pour y inclure non seulement la production d'aliments et fourrages, mais aussi leurs traitement, conservation et, finalement, distribution au consommateur.

Des fermentations auxquelles participent des anaérobies facultatifs ou stricts sont communément utilisées pour la conservation du fourrage destiné à la ferme. La fermentation d'une grande variété de fourrage vert, spécialement du maïs, du trèfle et de l'herbe, pour la production d'ensilage, a une grande valeur dans l'élevage des bestiaux. Nous sommes, en général, passablement familiers avec les séries de changements qui se produisent, bien qu'il reste encore beaucoup de travail fondamental à faire. Cette fermentation, servant à la conservation, est, dans un sens, la première étape du processus digestif des herbivores auxquels l'ensilage est donné. Nous avons vu que le ruminant diffère de la plupart des animaux par le fait que les hydrates de carbone sont transformés en acides organiques assimilables et utilisables, plutôt qu'en sucres simples. Un champ complet d'investigations utiles réside dans la corrélation entre la flore et les changements chimiques qui se produisent dans le silo et dans la panse.

Il y a aussi de nombreux aliments qui subissent des fermentations essentiellement anaérobies avant d'être consommés par l'homme. Généralement au cours de ces fermentations, la modification importante permettant la conservation est la transformation des hydrates de carbone en acides organiques, avec par conséquent abaissement du pH. Dans beaucoup de cas l'acide lactique en est le produit principal, mais d'autres acides peuvent

intervenir. M. Smit discutera les « Fermentations anaérobies naturelles », de sorte qu'il n'y a pas lieu de considérer ce sujet en ce moment. Notons cependant que les progrès de nos connaissances et de nos techniques devraient être employés à classer les modifications qui se produisent, notamment dans la structure fondamentale. Peut-être M. Raynaud en dira-t-il quelques mots dans sa discussion sur les « Anaérobies pectinolytiques ». Il y a là tout le problème de ce qui correspond dans le monde végétal aux hyaluronidases et aux collagénases des tissus animaux.

Nous aurons aussi la chance d'entendre M. Oakley parler de nos progrès dans la connaissance du facteur de diffusion, en particulier des hyaluronidases et des collagénases. Nous nous y intéressons naturellement, non seulement à cause de leur intérêt pathologique au cours des maladies, mais aussi à cause de leur rôle possible dans les transformations, désirables ou non, produites au cours de la maturation de la viande, et aussi de sa détérioration.

Le temps et la place me manquent pour analyser un autre domaine de signification agronomique, l'emploi de fermentations essentiellement anaérobies pour la préparation de certains aliments et condiments. Citons deux exemples pour illustrer le type de problème qu'il nous reste encore à traiter.

Une des étapes dans la préparation du café comprend un processus de fermentation. Le fruit du café est suffisamment écrasé pour permettre l'enlèvement mécanique des semences. Mais aux cosses de ces semences adhère une couche épaisse de matière mucilagineuse ou gommeuse. Les semences sont placées dans des cuves où se fait une fermentation vigoureuse. De l'alcool et des acides sont produits. Du point de vue rendement, cependant, il faut considérer deux étapes dans ce processus, la fermentation proprement dite et la « sobrefermentacion » ou post-fermentation d'après la phraséologie proposée par Choussy à San Salvador. La transformation essentielle, du point de vue rendement, produite au cours de la première fermentation, consiste en une dissolution partielle de la matière gommeuse, ce qui permet de s'en débarrasser aisément, mécaniquement ou par lavage. D'habitude cependant, la fermentation est poussée un peu au delà de ce point suivant la conception que ce temps additionnel a un effet avantageux sur l'arôme et la qualité du café. Il faut prendre beaucoup de précautions, sinon on risque une détérioration avec développement d'arôme butyrique. Tout ce qui se passe au cours de ces fermentations n'a été étudié que très imparfaitement, spécialement du point de vue effet des transformations anaérobies sur l'arôme et la qualité. Ce qui a été dit du café s'applique aussi au cacao. Les cosses de cacao sont ouvertes et les semences,

entourées d'une pulpe d'acide doux, sont placées dans des récipients convenables où la pulpe est fermentée. Ici de nouveau, une fermentation anaérobiose acide-alcool est utilisée pour dissoudre la pulpe de façon à pouvoir l'enlever mécaniquement. La température s'élève et il se produit certaines modifications des semences. Après fermentation, les semences sont prêtes à être nettoyées et séchées. La fermentation augmente-t-elle ou diminue-t-elle la qualité ? Ce problème a besoin de plus de recherches.

Nous avons enfin à considérer la question importante de la préparation de certaines fibres végétales par le procédé de rouissage. Ici le rôle des anaérobies est d'une importance primordiale et sera discuté plus adéquatement par M. Pochon et M. Raynaud. Il faut aussi mentionner ces organismes, particulièrement étudiés pendant la dernière guerre, qui attaquent les fibres en anaérobiose, en en produisant la détérioration rapide. Ils sont tous d'un grand intérêt agronomique.

Pour conclure, l'agriculture trouve un intérêt primordial dans certaines fermentations de produits agricoles qui fournissent des substances d'intérêt commercial. Parmi elles, il faut citer les fermentations anaérobies qui produisent de l'acétone, alcool butylique, alcool amylique, acide lactique, acide propionique, acide butyrique et autres. De plus en plus, de telles fermentations constituent une technique de transformation des matières hydrocarbonées, qu'il s'agisse de substances improches à la consommation humaine, produites en excès ou comme matières premières, soit de déchets agricoles ou de produits accessoires. Les rapports de M. Smit, « Fermentations anaérobies naturelles », et de M. Cohen, « Mécanisme de la fermentation acéto-butyrique anaérobiose », nous ferons mieux comprendre ce domaine. Dans les régions où des matières hydrocarbonées peuvent être produites à bon marché, comme par exemple les régions tropicales, il est très probable que des industries considérables pourront ainsi se développer.

# LES BACTÉRIES ANAÉROBIES FIXATRICES D'AZOTE

par A. C. THAYSEN.

(*Colonial Microbiological Research Institute  
Port of Spain, Trinité, Indes Occidentales Anglaises.*)

Je me souviens que lorsque j'étais très jeune et que j'ai dû passer ma thèse de Doctorat en Médecine, on me demanda de traiter la fixation biologique de l'azote. Comme le problème paraissait simple alors et combien il est devenu compliqué dans les décades qui ont suivi ! C'est ce qui m'est apparu, quand notre collègue le Dr Prévot m'a demandé, il y a quelque temps, de traiter ce sujet devant ce Congrès.

En relisant la littérature sur la question, littérature qui comprend les résultats d'un très grand nombre de recherches, j'ai eu l'impression que la simplicité première, basée sur l'ignorance, aboutissait à une confusion due peut-être à trop de spéculation. A cet état de choses succéda, au cours de la dernière décennie, un retour à la simplicité, basé sur l'appréciation des réactions par lesquelles certains micro-organismes sont capables d'activer l'azote atmosphérique et d'utiliser l'azote dans leur métabolisme. Mais même les travaux récents, me semble-t-il, négligent parfois le fait que, dans la fixation biologique de l'azote, nous nous trouvons en présence de réactions qui ont lieu dans un organisme vivant dans lequel plusieurs autres réactions se produisent simultanément, réactions qui peuvent parfois masquer le véritable processus de fixation.

Pour cette raison, Wilson et Burris (1947) proposent à juste titre, semble-t-il, que dans les recherches à venir, le processus de fixation, l'activation de l'azote, y compris sa fixation, soit considéré comme une réaction séparée, indépendante du sort subséquent de l'azote fixé dans la cellule vivante. Cette suggestion semble à retenir, car l'utilisation des groupes azotés fixés par la cellule vivante a été invoquée par certains chercheurs (Virchanen, 1938) à l'appui de leur conception de la fixation. Cette façon de voir doit être rejetée, car elle introduit des complications inutiles, du fait des continues transformations anaboliques et cataboliques de l'azote qui se produisent dans la cellule vivante, transformations qui n'ont pas de rapport direct avec la fixation. Braunstein (1947) a caractérisé ces transformations comme des

modifications incessantes des groupes azotés qui dépassent les limites d'une catégorie de composés. Les unités structurales des corps complexes se fondent, dit-il, en « la masse commune du métabolisme général » d'où elles sont extraites de nouveau pour la resynthèse des composés de toutes classes : protéines, acides aminés et toutes autres substances contenant de l'azote dans les proportions exigées par la rapidité des réactions automatiques au cours du métabolisme cellulaire et par l'influence des mécanismes régulateurs.

La fixation de l'azote est expliquée aujourd'hui par une des deux théories principales : la théorie de l'ammoniaque de Winogradsky (1893) et la théorie de l'hydroxylamine de Blom (1931). Récemment une troisième conception a été émise par Wilson et Burris (1947), d'après laquelle le processus suivrait les grandes lignes du métabolisme du  $\text{CO}_2$  des plantes vertes, avec formation d'un produit initial d'oxydation tel que l'acide hyponitreux, ou un intermédiaire moins毒ique. Il entrerait ainsi dans la « masse commune du métabolisme général ».

Avant de revenir à notre sujet des anaérobies fixateurs d'azote, il ne sera peut-être pas inutile de passer en revue quelques-unes des preuves expérimentales avancées en faveur de ces théories.

La théorie de Winogradsky soutient que l'azote atmosphérique se combine avec l'hydrogène moléculaire pour former de l'ammoniaque, cette réaction étant rendue possible par les micro-organismes fixateurs d'azote. Pour prouver ce qu'ils avançaient, Winogradsky (1930), et avant lui Kostyschev et son école (1925) ont recherché et effectivement mis en évidence l'ammoniaque comme produit final du métabolisme des *Azotobacter*. Malheureusement, l'analyse critique de leurs travaux par Burk et Horner (1936) a révélé que l'ammoniaque trouvée n'était pas un produit de la synthèse directe de l'azote atmosphérique, mais prenait naissance indépendamment des réactions ayant lieu dans la « masse commune du métabolisme ».

Cependant, depuis lors, les travaux d'autres chercheurs américains ont semblé montrer que l'ammoniaque peut être au moins un produit final du processus de fixation. Phelps et Wilson (1941), par exemple, ont montré que *Bact. radicicola* aussi bien qu'*Azotobacter* produit une hydrogénase. Ceci explique pourquoi l'hydrogène activé peut être présent dans les cultures de ces germes et réduire l'azote activé.

L'azote lui-même est-il activé ? Ceci n'a pas été prouvé expérimentalement, mais Burk (1934) et Wilson et Burris (1947) ont apporté d'autres arguments en faveur de la théorie de l'ammoniaque en montrant que l'ammoniaque utilisée comme seule source d'azote permet le développement normal d'*Azotobacter*. A cet égard, l'ammoniaque est, semble-t-il, unique, car c'est le seul

composé azoté qui arrête complètement et immédiatement le processus de fixation sans affecter la croissance. En outre, dans les expériences avec  $N^{15}$ , cet isotope s'accumule dans la même fraction des cellules hydrolysées que  $N^{14}$ , que l'isotope ait été fourni sous forme d'azote gazeux ou d'ammoniaque.

La théorie de l'hydroxylamine de Blom (1931) a été soutenue surtout par l'école de Virtanen (1938, 1939, 1949). Les auteurs finlandais supposent qu'au cours du processus de fixation, l'hydroxylamine, produit final de la fixation, se combine avec le groupe cétonique de l'acide oxalo-acétique avant d'atteindre des concentrations toxiques.

Par réduction, l'acide oximino-succinique qui en résulte donnerait de l'acide aspartique. L'oxime et l'acide aspartique ont été tous deux identifiés par les auteurs finlandais dans des cultures d'aérobies fixant l'azote. Il y a de bonnes raisons de penser que ces produits, comme l'ammoniaque de Winogradsky, prennent naissance à partir de la « masse commune du métabolisme », à la suite de réactions ayant lieu dans cette « masse » et que leur présence ne peut donc pas être invoquée en faveur de la théorie de l'hydroxylamine sous sa forme actuelle ; car, comme nous l'avons déjà dit, l'hydroxylamine est toxique (Novak et Wilson, 1948) et est donc incapable de permettre la croissance normale de *Torulopsis utilis* (Virtanen, 1948) ou d'*Azotobacter* (Pethica et Winter, 1949). De plus, dans leurs recherches avec l'isotope de l'azote, Burris et Wilson (1946) constatèrent que l'acide aspartique n'était pas le seul acide aminé qui pouvait être décelé. Au contraire, l'acide glutamique se rencontrait en plus grandes quantités que l'acide aspartique dans les hydrolysats d'*Azotobacter*. Et cet acide glutamique contenait une plus grande concentration de l'isotope que l'acide aspartique, prouvant qu'il devait être produit plus précoce-  
ment que l'acide aspartique, que Virtanen considère comme le premier acide aminé de *Bact. radicicola* poussant dans les nodules des racines.

La troisième théorie, telle qu'elle a été émise par Wilson et Burris (1947), soutient que l'azote activé se combine avec les groupes hydroxyles actifs pour former l'acide hyponitreux qui, d'après Molnar, Burris et Wilson (1948), inhibe la fixation de l'azote par *Azotobacter*, peut-être parce qu'il remplace l'azote atmosphérique. Cependant, la preuve expérimentale n'a pas encore été apportée.

Les preuves qui ont été accumulées jusqu'ici et qui semblent montrer de façon si nette que l'ammoniaque est le produit final de la fixation, dérivent presque exclusivement des recherches effectuées avec les micro-organismes aérobies fixateurs d'azote. Mais on sait peu de chose des réactions par lesquelles les anaérobies fixateurs d'azote, les *Clostridia*, effectuent l'activation de l'azote

atmosphérique et de la forme sous laquelle l'azote activé entre dans le métabolisme général de ces micro-organismes, sauf le fait, suggéré par Winogradsky (1948) que, là aussi, l'ammoniaque est le produit final de la fixation. Mais les preuves de Winogradsky reposent sur des observations semblables à celles qui appuyaient sa théorie de la fixation aérobie, et ne peuvent, par conséquent, être considérées comme entraînant la conviction.

Le problème de la fixation de l'azote par les *Clostridium* est donc un champ de recherches vierge qui, lorsqu'il sera exploré, apportera peut-être sa contribution à la compréhension complète de cet intéressant processus *biologique*. Je souligne intentionnellement le mot *biologique* car bien que les réactions qui provoquent la fixation soient chimiques ou physico-chimiques, les conditions *biologiques* dans lesquelles fonctionne le micro-organisme actif jouent leur rôle en établissant des conditions favorables à l'apparition des réactions chimiques. C'est pourquoi il est nécessaire de compléter nos connaissances sur les *Clostridium* qui peuvent utiliser l'azote atmosphérique et sur les conditions dans lesquelles ils le font. Le *Cl. pasteurianum* de Winogradsky (1893) n'est nullement le seul *Clostridium* qui fixe l'azote. Dans sa récente classification des anaérobies, Prévot (1948) ne compte pas moins de 82 espèces ou souches, dont 4 sont considérées comme fixant l'azote. Ce sont *Clostridium pasteurianum* (Winogradsky), *Cl. amylobacter* (Bredeman), *Cl. acetobutylicum* (Weizmann) et *Cl. nariculum* (Wehmer). Même parmi ces espèces, le degré de fixation semble varier ou avoir disparu, peut-être à cause de l'absence de certaines substances nutritives ou de traces d'éléments tels que le molybdène, que Bortels (1930), Burk (1934) et plusieurs autres auteurs considèrent comme essentiels pour la fixation. La question mériterait d'être étudiée.

Il serait important aussi de déterminer l'action de l'ammoniaque sur la croissance et la fixation de l'azote ; car il y a lieu de rappeler que Wilson et Burris (1947) admettent que seules les substances qui n'interviennent pas dans la fixation peuvent être regardées comme des produits terminaux possibles du processus de fixation.

Wilson et Burris (1947) estiment que la fixation de l'azote par *Azotobacter* est liée au développement du micro-organisme. Il serait important de savoir jusqu'à quel point il en va de même pour les *Clostridium*. Si ceci pouvait être confirmé, on pourrait alors soutenir que, dans des conditions favorables à la croissance, l'augmentation de la concentration des germes en culture pourrait être considérée comme une mesure de la fixation. On pourrait trouver là la base d'une technique biologique pour l'évaluation quantitative de la fixation qui, à bien des égards, serait préférable à l'analyse chimique.

Si la fixation dépendait de la multiplication des germes, cela impliquerait aussi que la fixation atteindrait son maximum en même temps que la multiplication, c'est-à-dire pendant la phase logarithmique. S'il en était réellement ainsi, les *Clostridium* pourraient apporter un peu de lumière sur le fonctionnement de l'hydrogénase. Car on a montré (Reilly et ses collaborateurs, 1920), que les acides organiques produits par *Cl. acetobutylicum* sont réduits en cétones et alcools longtemps après seulement que la croissance a passé son maximum. Ceci impliquerait, peut-être, que l'activité de l'hydrogénase est complètement absorbée dans la réduction de l'azote activé au cours de la croissance.

C'est ce qui a dû se produire dans les expériences de Fedorov (1917), dans lesquelles on a constaté qu'*Azotobacter* fixait l'azote atmosphérique en anaérobiose en présence d'un accepteur d'hydrogène, l'*o*-dinitrobenzène. Dans ce cas on pouvait admettre que tout surplus d'hydrogène non exigé par la fixation était fixé par l'*o*-dinitrobenzène et ainsi empêché d'inhiber la fixation réelle, comme on sait que le fait l'hydrogène. Si cette explication était possible, il serait prématuré de conclure, comme le fait Fedorov, que l'ammoniaque ne peut pas être considérée comme un produit final de fixation.

Mais, pour en revenir à la fonction de l'azote activé, s'il était prouvé que cet azote empêche l'hydrogène de se combiner avec les accepteurs d'hydrogène, tels que l'acide butyrique, pendant la période de multiplication active des *Clostridium*, c'est pendant cette période que ces germes devraient être utilisés pour étudier jusqu'à quel point la fixation de l'azote anaérobiose est influencée par des inhibiteurs tels que l'hydrogène (qui, comme on l'a montré, empêche la fixation chez les aérobies) et par les stimulants, tels que l'oxygène (qui augmente la fixation par *Azotobacter* (Wyss et Wilson, 1941), peut-être en favorisant la croissance.

Puisqu'il est peu vraisemblable que l'oxygène stimule le développement des *Clostridium*, une action positive de l'oxygène pourrait ici avoir pour résultat la production par ces germes d'une hémoprotéine, comme celle qu'a trouvée Piets (1938) dans les nodules des racines. Rappelons qu'une fonction spéciale a été attribuée à cette hémoprotéine (Keilin et Wang, 1945), fonction qui viendrait à l'appui de la 3<sup>e</sup> théorie du processus de fixation dont nous avons parlé plus haut.

Pour conclure ces quelques remarques sur le rôle qu'une étude des *Clostridium* pourrait jouer dans l'explication du processus de la fixation biologique de l'azote (remarques qui, je le fais observer, viennent d'un biologiste), je serais tenté d'ajouter qu'il pourrait être intéressant de déterminer s'il existe un rapport entre la synthèse des vitamines et la fixation de l'azote, étude pour laquelle les *Clostridium* conviendraient particulièrement. Tout

récemment Stoke, Larsen et Gunness (1947) ont trouvé que la biotine peut remplacer l'acide aspartique comme facteur de croissance pour certaines bactéries. Etant donné le rôle important joué par l'acide aspartique dans la fixation de l'azote, on peut peut-être se demander si cet effet de la biotine se limite aux réactions ayant lieu dans la « masse commune du métabolisme » de Braunstein, ou s'il va plus loin et s'étend au processus de fixation lui-même.

#### BIBLIOGRAPHIE

BLOM (J.). *Zentralbl. Bakt. II Abt.*, 1931, **84**, 60.

BORTELS (H.). *Arch. Mikrobiol.*, 1930, **1**, 333.

BRAUNSTEIN (A. E.). *Advances in Protein Chemistry*, 1947, **3**, 1.

BURK (D.). *Ergeb. Enzymforsch.*, 1934, **3**, 23.

BURK (D.) et HORNER (C. K.). *Soil Science*, 1936, **41**, 81.

BURRIS (R. H.) et WILSON (P. W.). *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 595.

FEDOROV (M. V.). *C. R. Acad. Sci. U. R. S. S.*, 1947, **55**, 53.

KEILIN (D.) et WANG (Y. L.). *Nature*, 1945, **155**, 227.

KOSTYSCHEV (S.). *Z. Physiol. Chem.*, 1925, **154**, 1.

MOLNAR (D. M.), BURRIS (R. H.) et WILSON (P. W.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 1713.

NOVAK (R.) et WILSON (P. W.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 517.

PHELPS (A. S.) et WILSON (P. W.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1941, **47**, 473.

PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de Classification et de Détermination des Bactéries anaérobies*, Masson, Paris, 1948.

PETHIGA (B. A.), ROBERTS (E. R.), et WINTER (E. R. S.). *Nature*, 1949, **163**, 408.

REILLY (J. W.), HICKINBOTTOM (J.), HENLEY (F. H.) et THAYSEN (A. C.). *J. Biochem.*, 1920, **14**, 229.

PIETZ (J.). *Zentralbl. Bakt. II, Abt.*, 1938, **99**, 1.

STOKE (J. L.), LARSEN (Alma) et GUNNESS (Marion). *J. Bact.*, 1947, **54**, 219.

VIRTANEN (A. L.). *Cattle Fodder and Human Nutrition*. Cambridge University Press, London, 1938.

VIRTANEN (A. L.). *Third Com. Intern. Soc. Soil Science Transaction A*, 1939, 4.

VIRTANEN (A. L.). *Nature*, 1948, **161**, 814.

WILSON (P. W.) et BURRIS (R. H.). *Bact. Rev.*, 1947, **11**, 41.

WINOGRADSKY (M. S.). *C. R. Acad. Sci.*, 1893, **116**, 1385.

WINOGRADSKY. *C. R. Acad. Sci.*, 1930, **190**, 661.

WYSS (A.) et WILSON (P. W.). *Proceed. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, 1941, **27**, 162.

WILSON (P. W.), HULL (J. F.) et BURRIS (R. H.). *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 1943, **29**, 289.

# LE MÉTABOLISME DES GAZ PAR LES BACTÉRIES ANAÉROBIES

par H. A. BARKER.

(*Division of Plant Nutrition,  
University of California, Berkeley, California.*)

Un grand nombre de substances plus ou moins volatiles sont produites ou utilisées par les bactéries anaérobies, mais quelques-unes seulement sont considérées par les bactériologistes comme étant des gaz. Dans l'exposé qui va suivre nous n'appellerons gaz que les substances de faible solubilité qui forment des bulles lorsqu'elles sont en contact avec des solutions aqueuses diluées à la pression atmosphérique. D'après cette définition, trois gaz seulement seront formés en quantité appréciable par les bactéries anaérobies strictes : le CO<sub>2</sub>, l'hydrogène et le méthane. Les gaz les plus fréquemment utilisés par les anaérobies sont CO<sub>2</sub> et H, bien que certains microorganismes puissent utiliser le CO. Dans le présent travail, nous insisterons surtout sur la formation du méthane et la transformation du CO<sub>2</sub> en acide acétique.

## LA FORMATION DU MÉTHANE.

Le méthane est formé en quantités énormes dans la nature à la suite de la décomposition des matériaux organiques en anaérobiose. Ce gaz est produit, ainsi que le CO<sub>2</sub>, dans les marais et les tourbières, dans l'eau douce et les sédiments marins contenant des matériaux organiques, dans les eaux usées, dans l'appareil digestif des animaux, en particulier des ruminants, etc.

Les premières observations sur le méthane ont été effectuées pour la plupart sur des systèmes naturels complexes, tels que des plantes en décomposition, qui contenaient une grande quantité de différents composés organiques et des micro-organismes. Dans ces systèmes il était impossible de distinguer quels composés étaient attaqués par les bactéries productrices de méthane. Pour ce faire, il fallait, ou bien isoler les bactéries en culture pure et étudier leur action sur des composés organiques sélectionnés, ou bien étudier l'action des cultures brutes de bactéries productrices de méthane sur des composés qui ne peuvent pas être attaqués par d'autres types d'anaérobies. L'isolement des bactéries du méthane

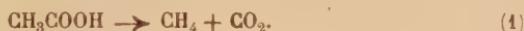
se révéla exceptionnellement difficile et n'a pu être réalisé qu'assez récemment. C'est pourquoi toutes les premières expériences sur la fermentation méthanique ont été faites avec des cultures impures et des substrats hautement sélectifs.

L'emploi de l'acétate comme substrat sélectif pour les bactéries du méthane a été introduit par Hoppe-Seyler en 1886 [10]. L'acétate est rapidement décomposé par différentes espèces de bactéries du méthane, tandis que d'autres anaérobies (sauf les bactéries réduisant les sulfates et les bactéries dénitritifiantes) sont incapables de l'attaquer. Le développement des bactéries sulfato-réductrices et dénitritifiantes peut être empêché dans une très large mesure en les cultivant sur des milieux dépourvus de sulfates et de nitrates. Des recherches plus récentes (Omelianski [15], Sölingen [17], Mazé [13, 14], Thayer [23], Buswell et ses collaborateurs [21, 22], Barker [4, 2, 4, 5], Schnellen [16] et d'autres [7, 8, 11, 18, 20]) ont montré que de nombreux autres composés pouvaient être substitués à l'acétate comme substrats hautement spécifiques pour les bactéries productrices de méthane. Les composés suivants permettent la culture de ces bactéries dans des milieux simples contenant surtout du bicarbonate et des sels minéraux : formate, acétate, propionate, *n*-butyrate, *n*-valérate, *n*-caproate, *n*-heptanoate, *n*-caprylate, *n*-caprate, laurate, palmitate, margarate, stéarate, hydrogène, CO<sub>2</sub>, méthanol, éthanol, *n*-propanol, *i*-propanol, *n*-butanol, *i*-butanol, sec.-butanol, *i*-pentanol, acétone, benzoate, phénylacétate, cinnamate, hydrocinnamate, oxalate et succinate. Cette liste est probablement incomplète ; elle comprend seulement les composés qui sont attaqués par d'autres types d'anaérobies avec les exceptions notées plus haut.

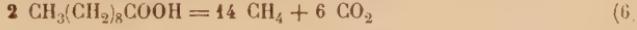
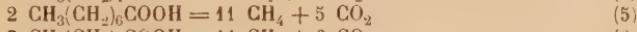
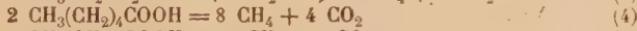
Il existe encore de nombreux autres composés organiques, tels que glucides, acides aminés et hydroxy-acides qui pourraient servir de substrats aux bactéries productrices de méthane [22]. Cependant, la certitude de l'utilisation de ces composés ne peut être obtenue par l'emploi de cultures enrichissantes, puisqu'ils sont très rapidement attaqués par d'autres types d'anaérobies. Il est impossible, par conséquent, de déterminer avec des cultures brutes si les bactéries du méthane attaquent directement ces substrats si fermentescibles, ou bien si elles utilisent des produits formés à partir de ces substrats par des bactéries associées. Les quelques observations faites avec des cultures pures *Methanobacterium omelianski* [4, 5], *Mb. formicicum* [16], *Methanosaarcina methanica* [2], *Ms. barkeri* [16] et *Methanococcus nielii* [18] donnent à penser que les bactéries du méthane se bornent à utiliser des composés organiques simples tels que ceux que nous avons énumérés dans le paragraphe précédent. On n'a jamais encore constaté l'attaque par aucune bactérie méthanique des glucides, acides aminés, hydroxy-acides, kéto-acides.

Le pouvoir de former du méthane semble limité à des bactéries appartenant à un groupe physiologique hautement spécialisé. Toutes les bactéries productrices de méthane étudiées jusqu'ici réalisent un processus catabolique dans lequel le méthane est le produit principal. On ne connaît pas jusqu'ici de bactéries formant du méthane comme sous-produit (produit secondaire) d'un autre type de fermentation, ce qui ne veut pas dire que de tels organismes ne puissent un jour être découverts. Il ne semble pas y avoir *a priori* de raison pour que le pouvoir de former du méthane ne soit pas associé à celui d'effectuer un autre type de processus anaérobiose.

La première étude importante des réactions chimiques catalysées par les bactéries productrices de méthane a été faite par Söhngen en 1906 [47], qui a confirmé les premières observations de Hoppe-Seyler sur la transformation de l'acide acétique en méthane et  $\text{CO}_2$  suivant l'équation 1.



Söhngen éprouva ensuite le pouvoir fermentaire d'autres acides gras par la méthode des cultures enrichies et constata que les sels des acides formique, butyrique, caproïque, caprylique et caprique étaient rapidement décomposés suivant les équations suivantes.

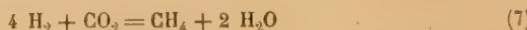


Les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone (propionique, valérianique, heptanoïque et nonylique), à l'exception de l'acide formique, n'étaient pas décomposés par les cultures de Söhngen ; mais cette absence de pouvoir fermentaire des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone n'a pas été confirmée par la suite. Bien qu'il semble vrai qu'il faille plus de temps pour obtenir des cultures enrichies actives avec des acides gras à nombre impair d'atomes de carbone, plusieurs chercheurs [23, 5 a, 19] ont montré que ces acides peuvent être décomposés par les bactéries du méthane.

Les expériences de Söhngen conduisent à la conclusion que le méthane est le seul carbure d'hydrogène formé en quantité appréciable à partir des acides gras contenant de 1 à 10 atomes de carbone. Des recherches postérieures [2, 14, 16, 22, 23] ont montré que ceci est vrai également pour les fermentations d'autres substrats, tels que alcools, cétones et composés aromatiques. En d'autres termes, la nature du produit caractéristique de fermentation, le méthane, n'a pas de rapport avec la structure du sub-

trat inorganique dont il dérive. Ce fait est important si l'on considère une des premières théories du mécanisme de la formation du méthane, à savoir : que le méthane prendrait naissance par une simple décarboxylation de l'acide acétique. Si une telle réaction a lieu, on doit s'attendre à ce que les acides gras supérieurs, tels que les acides propionique et butyrique, soient de même décarboxylés avec formation des hydrocarbures supérieurs correspondants, l'éthane et le propane. Etant donné que ces deux hydrocarbures ne sont pas formés, on doit conclure, ou bien qu'une simple décarboxylation ne se produit pas, ou que la réaction se limite à l'acide acétique.

L'apport le plus important de Söhngen au point de vue théorique a été la preuve que le méthane peut être formé biologiquement à partir d' $H_2$  et de  $CO_2$  (équation 7).

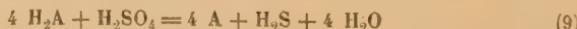


Dans ce processus, il est évident que le méthane dérive du  $CO_2$  par réduction. Ce phénomène remarquable a été signalé par Söhngen, mais sa signification quant au problème du mécanisme de la formation du méthane n'a été pleinement précisée que vingt-cinq ans plus tard.

Vers 1930 Van Niel exposa une théorie basée sur le travail de Söhngen pour rendre compte de la formation du méthane à partir de composés organiques et du  $CO_2$  [4]. Van Niel supposait que toute formation du méthane est un processus dans lequel l'oxydation d'un composé convenable, organique ou inorganique ( $H_2A$ ) est couplée avec la réduction du  $CO_2$  en méthane (équation 8). Ce processus serait analogue au processus de réduction

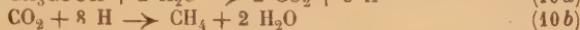


des sulfates (équation 9), où  $CO_2$  remplacerait le sulfate comme



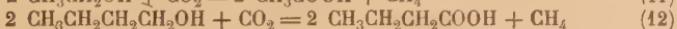
réducteur final. Dans le cas particulier, l'hydrogène gazeux étant le réducteur (équation 7), l'utilisation du  $CO_2$  est toujours observée. Cependant, quand on emploie un réducteur organique, l'oxydation complète du substrat donnerait plus de  $CO_2$  que ne le veut la théorie, et par conséquent  $CO_2$  devrait s'accumuler plutôt que disparaître. Dans la fermentation méthanique de l'acide acétique par exemple, l'oxydation complète de l'acide donnerait 2 mol. de  $CO_2$  (équation 10 a), tandis que le nombre d'équivalents d' $H_2$  rendus disponibles par l'oxydation serait juste suffisant pour réduire 1 mol. de  $CO_2$  en méthane (équation 10 b). Par conséquent, le résultat net serait la formation d'une mol. de méthane et d'une mol. de  $CO_2$  par mol. d'acide acétique décom-

posé (équation 10 c). Ceci est identique à l'équation établie expérimentalement par Hoppe-Seyler et Söhngen (équation 1).

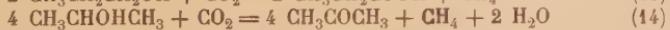
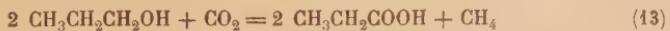


Le simple fait que la théorie de la réduction du  $\text{CO}_2$  peut rendre compte des rendements observés de  $\text{CO}_2$  et de méthane à partir de l'acide acétique et d'autres substrats ne prouve pas que cette théorie soit juste. Ceci ne pourrait être prouvé qu'en montrant spécifiquement que  $\text{CO}_2$  est le précurseur du méthane, quel que soit le type du substrat.

En 1935 j'ai essayé de montrer expérimentalement qu'une réduction du  $\text{CO}_2$  se produit pendant la fermentation de composés organiques [1]. Avec les méthodes dont on disposait à cette époque, ceci ne pouvait être fait qu'avec les espèces de bactéries méthaniques qui provoquent une oxydation incomplète d'un substrat organique, n'impliquant pas la formation de  $\text{CO}_2$ . Si une quantité importante de  $\text{CO}_2$  était formée, elle masquerait l'utilisation simultanée de ce composé. Heureusement, Omelianski avait déjà décrit une fermentation méthanique qui semblait devoir permettre de satisfaire à ces exigences [15]. Il avait montré que, lorsque l'alcool éthylique était employé comme substrat d'une culture enrichissante, les gaz émis étaient constitués presque entièrement par du méthane et qu'il était nécessaire d'ajouter du carbonate de Ca pour neutraliser l'acide qui se formait. Ceci donnait à penser qu'une réduction se produisait, dans laquelle l'alcool était oxydé jusqu'au stade acide acétique. Cette possibilité fut confirmée et on constata, par les méthodes quantitatives, que la fermentation méthanique des alcools éthylique et butyrique dans des milieux contenant du  $\text{CO}_2$  en abondance se faisait suivant les équations 11 et 12. Plus tard, l'organisme responsable



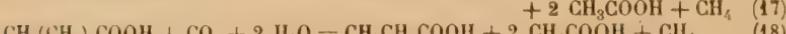
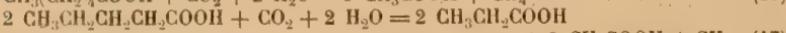
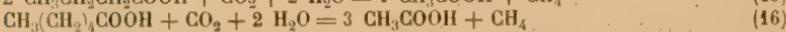
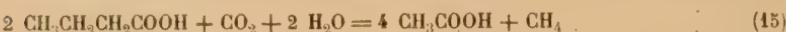
de cette fermentation, *Methanobacterium omelianski*, fut isolé en culture pure et on montra qu'il décomposait plusieurs autres alcools primaires et secondaires de la même façon [4, 5]. Schnellen étudia la fermentation des alcools *n*-propylique et *i*-propylique en cultures enrichissantes [16] et constata que ces corps étaient décomposés de la même manière (équations 13 et 14). Les



résultats ci-dessus prouvent que le  $\text{CO}_2$  est réduit dans la fermentation méthanique des alcools primaires et secondaires exac-

tement de la même façon que lorsque  $\text{H}_2$  gazeux est utilisé comme substrat.

Une autre preuve en faveur de la théorie de la réduction du  $\text{CO}_2$  a également été obtenue de la fermentation méthanique de plusieurs acides gras. En 1936, j'observai que l'acide butyrique était partiellement oxydé en acide acétique en culture enrichissante et que cette oxydation s'accompagnait d'une transformation de  $\text{CO}_2$  en méthane [1]. Nos connaissances de ce type de fermentation méthanique se sont beaucoup développées à la suite du travail de Thressa Stadtman dans mon laboratoire ; elle obtint des cultures enrichissantes purifiées d'une nouvelle espèce de bactérie du méthane, *Mb. suboxydans*, qui oxyde les acides butyrique et caproïque en acide acétique (équations 15 et 16) et oxyde les acides valérique et heptanoïque en acides acétique et propionique (équations 17 et 18). Comme cette bactérie est incapable de

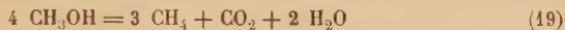


former du  $\text{CO}_2$  à partir des acides acétique et propionique, la quantité de  $\text{CO}_2$  utilisée est égale au méthane formé.

Les expériences que je viens de décrire sont en complet accord avec la théorie de la formation du méthane par la réduction du  $\text{CO}_2$ . Tous les doutes concernant l'origine du méthane dans ces fermentations particulières ont été dissipés en marquant le  $\text{CO}_2$  avec un  $^{14}\text{C}$ , isotope à longue vie du C. Thressa Stadtman a ainsi montré que tout le méthane formé par *Mb. omelianski* à partir de l'alcool éthylique et par *Mb. suboxydans* à partir de différents acides gras, est dérivé du  $\text{CO}_2$  [18].

Considérons maintenant les fermentations dans lesquelles le  $\text{CO}_2$  est produit au lieu d'être consommé. Où trouve-t-on la preuve de l'origine du méthane dans ces fermentations ? Jusqu'en 1940, il n'était guère possible de faire plus que de spéculer sur le mécanisme de ces processus. On a montré qu'une quantité adéquate de  $\text{CO}_2$  ou de bicarbonate favorise la croissance des bactéries productrices de méthane. Mais ceci ne constitue pas une preuve du rôle du  $\text{CO}_2$  comme précurseur du méthane, parce que beaucoup d'autres bactéries qui ne forment pas de méthane exigent aussi du  $\text{CO}_2$  et sont stimulées par une augmentation de la concentration de cette substance dans le milieu. Ce n'est que lorsqu'on disposa des isotopes du C et qu'on put faire des expériences avec des éléments marqués qu'il fut possible d'étudier le rôle du  $\text{CO}_2$  dans les fermentations méthaniques produisant du  $\text{CO}_2$ .

Les premières expériences de ce genre furent faites en 1940 avec  $^{14}\text{C}$  [3]. Etant donné la courte vie (vingt minutes) de cet isotope radioactif et l'inexpérience des chercheurs, les résultats obtenus avaient pour but de découvrir si le méthane produit dans la fermentation de l'alcool méthylique (équation 19) par *Ms. bar-*



*keri* dérive du  $\text{CO}_2$ . Pour ce faire, on fit agir des suspensions bactériennes sur de l'alcool méthylique en présence du  $\text{CO}_2$  marqué. Le méthane formé était radioactif et on en conclut qu'une partie au moins avait été formée aux dépens du  $\text{CO}_2$ . Le pourcentage du méthane total issu de cette source ne fut pas déterminé.

En 1948, Buswell et Sollo publièrent un important travail qui montra pour la première fois que le méthane peut être formé par un mécanisme autre que la réduction du  $\text{CO}_2$  [6]. Des cultures enrichissantes furent employées pour fermenter l'acétate (équation 1) en présence de  $\text{CO}_2$  contenant du  $^{14}\text{C}$  marqué. Les gaz produits furent récoltés à des intervalles variés et l'activité spécifique (nombre d'impulsions à la minute par mM) du méthane fut comparée à celle du  $\text{CO}_2$ . Le rapport de ces deux activités spécifiques donna la mesure de la fraction du méthane provenant du  $\text{CO}_2$ . On constata qu'une quantité relativement faible du méthane provenait de cette source. L'activité spécifique du méthane récolté deux jours après le départ de la fermentation était approximativement 0,5 p. 100 de celle du  $\text{CO}_2$ ; au bout de douze jours, la valeur s'était élevée à 5 p. 100. Si nous admettons que le  $\text{CO}_2$  est en équilibre isotopique à l'intérieur et à l'extérieur de la bactérie, ces résultats prouvent que 0,5 à 5 p. 100 seulement du méthane proviennent du  $\text{CO}_2$ ; les 95 à 0,95 p. 100 qui restent doivent avoir été formés à partir de l'acide acétique par un processus dans lequel le  $\text{CO}_2$  n'intervient pas. Ceci est la première preuve évidente que la théorie de la réduction du  $\text{CO}_2$  n'est pas applicable d'une façon absolument générale.

Les expériences de Buswell et Sollo ont été récemment répétées et pleinement confirmées dans mon laboratoire [49]. Dans nos expériences, une culture d'enrichissement par acétate d'une espèce de *Methanococcus* a été utilisée. L'activité spécifique du méthane obtenu en faisant fermenter l'acétate non marqué en présence de bicarbonate à  $^{14}\text{C}$  marqué indiqua que 3 à 10,7 p. 100 du méthane était formé par réduction du  $\text{CO}_2$ . Nos résultats, en ce qui concerne la réduction de l'activité spécifique du  $\text{CO}_2$  au cours de la fermentation, montrent qu'une molécule de  $\text{CO}_2$  seulement est formée par molécule d'acétate décomposée. La théorie de la réduction du  $\text{CO}_2$  (équation 10 a) prédit la formation de 2 mol. de  $\text{CO}_2$ .

Nous avons ensuite cherché à savoir si le C du méthane dérive du groupe carboxyle ou du groupe méthyle de l'acide acétique, ou des deux. Deux séries d'expériences avec des éléments marqués furent entreprises, l'une avec un acide acétique contenant un carboxyle marqué, l'autre avec un acide acétique contenant un groupe méthyle marqué. Dans le premier cas on obtient un  $\text{CO}_2$  fortement marqué (7.000 pulsations à la minute par mM) et un méthane légèrement marqué (850). Les rapports quantitatifs étaient tels qu'on put conclure que presque tout le  $\text{CO}_2$  produit provenait du groupe carboxyle. La teneur en isotope du méthane peut s'expliquer par la faible utilisation du  $\text{CO}_2$  observée dans les expériences précédentes. Étant donné que, dans ces expériences, le  $\text{CO}_2$  marqué était apporté dans le milieu et que le  $\text{CO}_2$  marqué était probablement formé à l'intérieur de la bactérie, ce résultat indique que le  $\text{CO}_2$  entre et sort de la cellule bactérienne avec une grande facilité. L'expérience avec acide acétique à méthyle marqué et  $\text{CO}_2$  non marqué fournit du méthane fortement marqué et du  $\text{CO}_2$  faiblement marqué. La comparaison de l'activité spécifique de l'acide acétique ajouté (52.500 pulsations à la minute par mM) avec celle du méthane (45.300-49.300) prouve que 86 à 94 p. 100 du méthane doivent dériver du groupe méthyle. 3 p. 100 environ du  $\text{CO}_2$  formé provenaient de la même source.

Les résultats des expériences ci-dessus sur la fermentation méthanique de l'acide acétique peuvent être résumés comme suit : une petite fraction seulement du méthane est formée par réduction du  $\text{CO}_2$ ; l'acide acétique est décomposé de telle façon que le groupe méthyle est transformé surtout en méthane et le groupe carboxyle en  $\text{CO}_2$ .

Étant donné le comportement anormal de l'acide acétique, il semble intéressant d'étudier la fermentation d'autres composés voisins qui sont décomposés par les bactéries du méthane avec une nette formation de  $\text{CO}_2$ . Thressa Stadtman a récemment étudié la fermentation de deux composés de ce type, l'acide propionique et l'alcool méthylique, au moyen de la méthode des éléments marqués [18].

L'acide propionique est quelquefois converti en  $\text{CO}_2$  et méthane suivant l'équation 20. On ne sait pas jusqu'ici si cette réaction

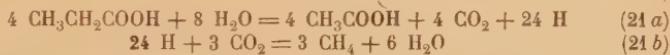


est catalysée par un type de bactéries du méthane où si la participation de deux espèces ou plus est nécessaire. Quoi qu'il en soit, la culture enrichissante employée par Thressa Stadtman dans les expériences que nous allons décrire contenait une bactérie, *Mb. propionicum*, qui oxyde l'acide propionique en acide

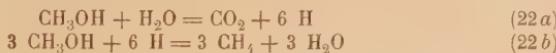
acétique seulement (équation 21). L'origine du méthane dans ce



processus a été étudiée en présence de  $\text{CO}_2$  contenant un  $^{14}\text{C}$  marqué. L'activité spécifique du méthane produit était très voisine de l'activité spécifique moyenne du  $\text{CO}_2$  pendant la fermentation, ce qui prouvait que la plus grande partie, sinon tout le méthane, provenait du  $\text{CO}_2$ . Bien que la formation nette de  $\text{CO}_2$  ait été inférieure à 1/4 de molécule par molécule de propionate décomposé, la diminution de l'activité spécifique du  $\text{CO}_2$  pendant la fermentation était beaucoup plus grande qu'on n'aurait dû s'y attendre. A partir de cette diminution, on calcula qu'une molécule environ de  $\text{CO}_2$  était formée par molécule de pyruvate. Ce résultat et la formation observée d'acide acétique montrent que la fermentation du propionate implique les réactions suivantes (équations 21 a, 21 b).



La fermentation méthanique de l'alcool méthylique (équation 22) a été de nouveau étudiée récemment par la méthode des éléments marqués en employant une culture partiellement purifiée d'une espèce de *Methanosaicina*, peut-être *Ms. barkeri* [18]. Les résultats obtenus en faisant fermenter de l'alcool méthylique non marqué (équation 19) en présence de  $\text{CO}_2$  marqué avec du  $^{14}\text{C}$  montrent (en accord avec les premières expériences qualitatives avec  $^{11}\text{C}$ ) qu'une certaine quantité de méthane est formée aux dépens du  $\text{CO}_2$ . Cependant la comparaison des activités spécifiques du méthane et du  $\text{CO}_2$  montre que 1 p. 100 seulement du méthane peut provenir de cette source. D'après ces résultats, la fermentation de l'alcool méthylique pourrait être interprétée comme une dismutation où l'oxydation d'une molécule d'alcool méthylique en  $\text{CO}_2$  est couplée avec la réduction de 3 mol. d'alcool méthylique en méthane (équations 22 a et 22 b). Cepen-



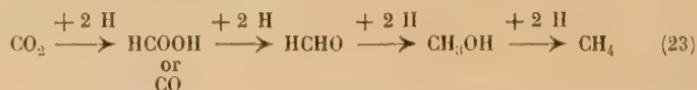
dant cette façon de voir est certainement trop simple. Comme nous le verrons plus loin, il existe plusieurs bactéries méthaniques qui ne peuvent pas réduire l'alcool méthylique en méthane ou bien qui le font très lentement. C'est probablement pour cette raison que les bactéries qui font fermenter l'alcool méthylique possèdent un mécanisme spécial pour convertir leur substrat, peut-être par oxydation, en quelque autre composé qui puisse être réduit en méthane.

Toutes ces expériences prouvent donc que la théorie de la réduction du  $\text{CO}_2$  ne permet pas de rendre compte de tous les cas de formation biologique du méthane. Dans la fermentation de la plupart des substrats jusqu'ici étudiés, le méthane dérive du  $\text{CO}_2$ . Cependant la décomposition de deux composés, acide acétique et alcool méthylique, ne cadre pas avec la théorie, puisque le méthane dérive de ces substrats par un mécanisme qui n'implique pas la réduction du  $\text{CO}_2$ .

#### MÉCANISME DE LA RÉDUCTION DU $\text{CO}_2$ EN MÉTHANE.

Différentes recherches ont été faites sur le mécanisme par lequel le  $\text{CO}_2$  est converti en méthane [20, 12, 16, 19, 18], mais jusqu'à présent nous savons peu de chose de ce processus. La plupart des résultats ont un caractère négatif et indiquent seulement quels sont les composés qui ne sont pas impliqués dans la réduction du  $\text{CO}_2$ .

La théorie la plus simple qui puisse être avancée pour expliquer la formation du méthane est la réduction successive du  $\text{CO}_2$  par une série de composés en  $\text{C}_1$ , comme suit :



Stephenson et Sictkland [20] ont étudié cette théorie au moyen d'une culture purifiée d'une bactérie méthanique qui était capable de pousser sur du formate (équation 2). Des suspensions de ce germe catalysaient la formation de méthane à partir de  $\text{H}$  gazeux et  $\text{CO}_2$  (équation 7).  $\text{H}$  pouvait aussi être employé pour réduire l'acide formique, le  $\text{CO}$ , la formaldéhyde (sous forme d'hexaméthylénététramine) et l'alcool méthylique en méthane, suivant les équations suivantes :



Si ces composés à un atome de carbone sont intermédiaires dans la transformation du  $\text{CO}_2$  en méthane, ils devraient être réduits aussi facilement ou plus que  $\text{CO}_2$ . Ceci ne se vérifie que pour le formate. Les autres composés sont réduits plus lentement que  $\text{CO}_2$  : ils ne peuvent par conséquent pas être des intermédiaires. Le rôle de l'acide formique était plus douteux, puisque le micro-organisme contenait un enzyme (hydrogène-lyase formique) qui permet la transformation l'un dans l'autre du formate et du  $\text{CO}_2$ . De plus, puisque la bactérie transforme le formate en  $\text{CO}_2$  et

méthane, on devait s'attendre à une absorption d'H correspondant au CO<sub>2</sub> formé, qui ne prouverait pas la réduction directe du formate. Il ne fut donc pas possible de décider lequel du CO<sub>2</sub> ou du formate était le précurseur le plus immédiat du méthane.

La preuve définitive contre la production du formate et de l'alcool méthylique dans la réduction du CO<sub>2</sub> fut obtenue au cours de recherches avec une culture pure de *Mb. omelianski* [4, 5]. On essaya de substituer ces composés au CO<sub>2</sub> en tant qu'oxydants dans la fermentation de l'alcool éthylique (équation 11). On constate que l'alcool méthylique n'était pas du tout utilisé par la bactérie ; le formate était lentement décomposé avec formation finale de méthane si le CO<sub>2</sub> était également présent, mais la vitesse de la décomposition du formate était beaucoup plus lente que celle de l'utilisation du CO<sub>2</sub>. En l'absence de CO<sub>2</sub>, le formate n'était pas attaqué.

Thressa Stadtman utilisa la méthode des éléments marqués pour tenter d'éclaircir les réactions du formate [18]. Elle fit fermenter de l'alcool éthylique non marqué et du CO<sub>2</sub> en présence de formate contenant un <sup>14</sup>C marqué et arrêta l'expérience avant qu'aucun des trois substrats ait été entièrement décomposé. La répartition du <sup>14</sup>C dans les substrats résiduels et les produits, acide acétique et méthane, fut déterminée. On retrouva l'isotope dans le CO<sub>2</sub>, le formate et le méthane et les 3 composés avaient sensiblement la même activité spécifique. L'alcool éthylique et l'acide acétique n'étaient pas marqués. Ces résultats montrent que le CO<sub>2</sub> et le formate sont rapidement transformables l'un dans l'autre, probablement sous l'influence catalytique d'une déshydrogénase formique. En raison de cette réaction, le marquage spécifique du formate fut perdu et par conséquent l'expérience ne donna aucun renseignement sur la réduction directe possible du formate en méthane. Si l'on considère toutes les preuves obtenues avec *Mb. omelianski*, il semble sage de conclure que le formate est décomposé surtout par une transformation oxydative en CO<sub>2</sub>. Si une réduction directe du formate a lieu, elle doit être très lente.

D'autres résultats sur le rôle des composés en C<sub>1</sub> dans la réduction du CO<sub>2</sub> ont été publiés par Kluyver et Schnellen [12]. Ces auteurs ont fait la plupart de leurs expériences avec des cultures pures de *Mb. omelianski*, *Mb. formicicum* et *Ms. barkeri*. Toutes ces bactéries transforment un mélange de H et CO<sub>2</sub> en méthane, mais contrairement aux organismes étudiés par Stephenson et Stickland [20], ils sont incapables d'effectuer la réduction du formate, formaldéhyde ou alcool méthylique par l'hydrogène, sauf quand le composé en question est fermenté avec formation de CO<sub>2</sub>.

On a étudié tout spécialement l'utilisation du CO qui est fer-

menté par *Ms. barkeri* et *Mb. formicicum* (équation 28). Théoriquement cette fermentation impliquerait une réduction directe du CO, ou bien le CO serait d'abord transformé en CO<sub>2</sub> et H (équation 29), comme l'avaient suggéré Fischer et coll. [8, 9] il



que ce soit cette fermentation impliquerait une réduction directe du CO, ou bien le CO serait d'abord transformé en CO<sub>2</sub> et H (équation 29), comme l'avaient suggéré Fischer et coll. [8, 9] il



y a quelques années, et le CO<sub>2</sub> pourrait alors être réduit en méthane (équation 7). Kluyver et Schnellen ont apporté la preuve que cette dernière alternative était exacte. Ils ont montré que lorsque CO était fermenté dans un système clos contenant de l'alcali fort, une quantité considérable d'H peut s'accumuler, comme on pouvait s'y attendre d'après l'équation 29. Une nouvelle preuve du fait que CO peut être un intermédiaire normal dans la réduction du CO<sub>2</sub> a été fournie lorsqu'on a montré que *Mb. omelianski* était incapable d'attaquer CO aussi bien en présence qu'en l'absence d'H.

De tout ce qui précède il résulte que l'acide formique, le CO, la formaldéhyde et l'alcool méthylique ne sont pas des intermédiaires normaux dans la réduction du CO<sub>2</sub> en méthane, et jusqu'ici nous ne connaissons aucun composé qui soit directement impliqué dans ce processus.

La découverte récente du fait que l'alcool méthylique et le carbone méthylique de l'acide acétique, aussi bien que le CO<sub>2</sub>, peuvent être des précurseurs du méthane, semble compliquer le problème du mécanisme de la formation du méthane, mais en fin de compte, il peut aider à le résoudre. A première vue, il peut sembler que la formation du méthane à partir de trois précurseurs exige trois mécanismes entièrement différents, mais ce n'est pas nécessairement vrai. Une explication plus vraisemblable est que ces trois précurseurs, et d'autres qui peuvent encore être découverts entrent dans le processus d'un métabolisme commun aboutissant au méthane. Cette façon de voir est appuyée par le fait que les bactéries qui décomposent l'acétate et l'alcool méthylique sont également capables de réduire le CO<sub>2</sub> quand on leur fournit l'H gazeux comme réducteur [16]. Il semble improbable qu'un même organisme possède deux mécanismes différents pour produire du méthane. Si l'idée d'un processus métabolique commun est exacte, la découverte de nouveaux précurseurs du méthane aiderait à éclaircir le mécanisme général de sa formation.

#### SYNTÈSE DE L'ACIDE ACÉTIQUE A PARTIR DU CO<sub>2</sub>.

Le CO<sub>2</sub> est utilisé par les bactéries anaérobies de diverses manières en dehors de celles qui aboutissent à la formation du

méthane. Par la méthode des éléments marqués et par d'autres moyens, on a montré que  $\text{CO}_2$  peut être incorporé dans les composés suivants par des bactéries d'un ou de plusieurs types : formate, acétate, propionate, butyrate, succinate, pyruvate, lactate, glycine et alcool *n*-propylque. La littérature sur le rôle du  $\text{CO}_2$  dans la synthèse de plusieurs de ces composés a été passée en revue [37, 40]. La discussion présente portera surtout sur la synthèse de l'acide acétique à partir du  $\text{CO}_2$ .

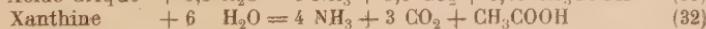
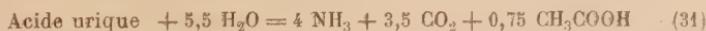
A peu près au moment où fut établi le rôle du  $\text{CO}_2$  dans le métabolisme des bactéries de l'acide propionique [41] et productrices de méthane [4, 2], Wieringa [39] découvrit une bactérie, *Clostridium aceticum*, qui peut convertir  $\text{H}$  et  $\text{CO}_2$  en acide acétique (équation 30). Cet organisme n'est pas autotrophe, puisqu'il exige l'acide glutamique et au moins trois facteurs de crois-



sance [36] et peut faire fermenter le glucose, mais il semble capable de tirer l'énergie nécessaire à sa croissance de la réaction ci-dessus, qui peut être considérée comme une oxydation de  $\text{H}$  couplée avec une réduction du  $\text{CO}_2$  donnant de l'acide acétique.

Depuis que Wieringa a découvert *Clostridium aceticum* et étudié son métabolisme, on a trouvé plusieurs autres bactéries anaérobies capables de réduire le  $\text{CO}_2$  de la même façon, mais utilisant des composés organiques au lieu d'hydrogène gazeux comme réducteurs. Etant donné que l'oxydation de composés organiques aboutit souvent à la formation de  $\text{CO}_2$ , l'utilisation simultanée de  $\text{CO}_2$  par ces bactéries est généralement masquée et n'aurait pu être établie avec certitude sans l'emploi des isotopes marqués du carbone.

Les premiers résultats en faveur d'une formation de l'acide acétique à partir du  $\text{CO}_2$  par les bactéries qui décomposent les composés organiques ont été obtenus par Barker et Beck [26] au cours d'une étude de la décomposition des purines par *Clostridium acidi-urici*. Ce germe attaque l'acide urique, la xanthine, la guanine et l'hypoxanthine, les produits étant l'ammoniaque, le  $\text{CO}_2$  et l'acide acétique. Les rendements de  $\text{CO}_2$  dépendent, bien entendu, de l'état d'oxydation du substrat. L'acide urique, le substrat le plus hautement oxydé, donne 3 mol. 1/2 de  $\text{CO}_2$  et 3/4 mol. d'acide acétique (équation 31). La xanthine, un sub-



strat plus réduit, donne 3 mol. de  $\text{CO}_2$  et 1 mol. d'acide acétique (équation 32) ; l'hypoxanthine, le substrat le plus réduit, donne 2 mol. 1/2 de  $\text{CO}_2$  et 1 mol. 1/4 d'acide acétique (équation 33).

Ce dernier résultat, la formation de plus d'une molécule d'acide acétique par molécule d'hypoxanthine, est particulièrement important pour la discussion présente, car il prouve que l'acide acétique doit être formé par quelque mécanisme autre qu'une simple rupture de la chaîne centrale de 3 C dans la molécule de purine. Un mécanisme possible qui tiendrait compte des résultats de Wieringa serait la synthèse de l'acide acétique à partir du  $\text{CO}_2$ . Cette possibilité a été étudiée en faisant fermenter l'hypoxanthine ou l'acide urique (le résultat final est le même avec l'un ou l'autre substrat) en présence de  $\text{CO}_2$  à atome de C radioactif [34]. L'acide acétique formé comme résultat de la décomposition de la purine dans ces conditions a été trouvé radioactif et contenait l'isotope dans les deux atomes de C. Ceci prouve qu'une partie au moins de l'acide acétique était dérivée du  $\text{CO}_2$ . Des expériences récentes ont prouvé que 1/5 environ de l'acide acétique provenait de cette source [35] ; le reste du C de l'acide acétique dérive du C en positions 2, 5 et 8 de l'acide urique.

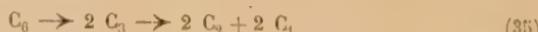
Une autre bactérie, *Clostridium cylindrosporum*, attaque l'acide urique et forme de la glycine en plus de l'acide acétique, du  $\text{CO}_2$  et de l' $\text{NH}_3$ . Les expériences avec les éléments marqués ont montré [27] que le groupe carboxyle de la glycine aussi bien que les deux atomes de C de l'acide acétique dérivent, eux aussi, partiellement du  $\text{CO}_2$  ; le carbone méthylène de la glycine vient presque entièrement de l'acide urique.

Un des meilleurs exemples de micro-organismes qui combinent l'oxydation d'un composé organique avec la réduction du  $\text{CO}_2$  en acide acétique est le *Clostridium thermoaceticum*. Cette bactérie a été isolée par Fontaine et ses collaborateurs [34] d'une culture d'enrichissement par cellulose et décompose le glucose de façon à donner de l'acide acétique comme seul produit en dehors des matériaux cellulaires (équation 34). Le rendement réel en acide



acétique était un peu moindre que celui auquel on s'attendait d'après l'équation et se montait environ à 2,5 mol. par molécule de glucose décomposé.

Ce qu'il y a de remarquable dans la fermentation effectuée par *C. thermoaceticum*, c'est que l'acide acétique ne s'accompagne pas d'une quantité équimoléculaire de  $\text{CO}_2$  ou d'un autre composé en  $\text{C}_1$ . Dans presque toutes les fermentations qui avaient été étudiées jusqu'alors, les composés en  $\text{C}_2$  et  $\text{C}_1$  étaient presque toujours formés en quantité équivalente. Ceci est une conséquence du mécanisme glycolytique bien connu dans lequel un hexose est scindé suivant le schéma :



La formation du composé en  $C_2$ , l'acide acétique, sans formation d'un composé en  $C_1$  pourrait être due soit à un nouveau type de décomposition du sucre dans lequel l'hexose est scindé en 3 fragments en  $C_2$ , soit à une transformation du composé en  $C_1$  tout d'abord formé, probablement le  $CO_2$ , en acide acétique.

Pendant la guerre, alors qu'on ne pouvait se procurer les isotopes du C, on a tenté de savoir par des méthodes indirectes laquelle de ces deux possibilités était juste [25]. On a soutenu que, si une décomposition du glucose implique le clivage de la molécule en 3 fragments en  $C_2$ , la décomposition du pentose devrait donner 2 fragments  $C_2$  et 1 fragment  $C_1$ . Si, au contraire, l'acide acétique est synthétisé entièrement ou en partie à partir du  $CO_2$ , il devrait être le seul produit de la fermentation d'un pentose aussi bien que de celle d'un hexose. L'expérience a montré, en effet, que l'acide acétique est le seul produit formé à partir du *L*-xylose. Ceci viendrait à l'appui de l'hypothèse de la réduction du  $CO_2$ .

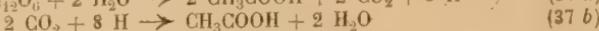
Une autre preuve dans le même sens a été obtenue par la fermentation du pyruvate. Etant donné que ce substrat est plus oxydé qu'un glucide, sa décomposition doit donner un  $CO_2$  ou un autre composé plus oxydé que l'acide acétique. Le  $CO_2$  et l'acide acétique sont en effet les seuls produits. S'il n'y a pas de réduction du  $CO_2$ , on ne doit pas s'attendre à obtenir plus d'une molécule d'acide acétique et moins d'une molécule de  $CO_2$  par molécule de pyruvate décomposé. En réalité, le rendement en acide acétique (équation 36) était notablement plus élevé que cela, tandis que



celui de  $CO_2$  était seulement 0,5 mol. par molécule de pyruvate. Ces résultats étaient en accord avec le fait que 2 mol. de  $CO_2$  (pour 4 mol. de pyruvate) sont transformées en une molécule supplémentaire d'acide acétique.

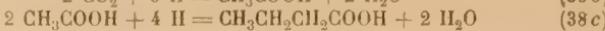
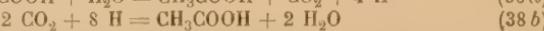
La preuve que l'hypothèse de la réduction du  $CO_2$  est correcte a été donnée plus tard [29] en faisant fermenter du glucose non marqué par *C. thermoaceticum* en présence de  $CO_2$  à atome de  $^{14}\text{C}$  marqué. L'acide acétique qui en résultait contenait l'isotope dans les deux atomes de C. Dans quelques expériences, les groupes méthyle et carboxyle ont été également marqués, tandis que dans d'autres le groupe carboxyle contenait plus de  $^{14}\text{C}$  que le groupe méthyle. La quantité de  $CO_2$  formée à partir du glucose a pu être calculée à partir de la réduction observée de l'activité spécifique du  $CO_2$  au cours de la fermentation. Ceci indique que 2 mol. environ de  $CO_2$  sont formées par molécule de glucose décomposé. L'équation 37 expose schématiquement les réactions

impliquées dans la « fermentation produisant de l'acide acétique » du glucose.



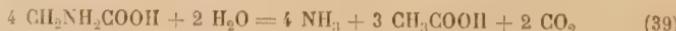
Le pouvoir de transformer  $CO_2$  en acide acétique n'est pas limité aux *Clostridium*. Deux bactéries non sporulées, *Butyri-aeratum rettgeri* et *Diplococcus glycinophilus*, se sont également montrées capables d'effectuer cette réaction.

*B. rettgeri* provoque une fermentation du lactate à type acide butyrique modifiée, les produits principaux étant  $CO_2$  et les acides acétique et butyrique [28]. Le caractère distinctif de cette fermentation, qui donne immédiatement à penser à un métabolisme utilisant le  $CO_2$ , c'est le rendement relativement faible en  $CO_2$  (0,5 mol. par molécule de lactate) par rapport aux acides en  $C_2$  et  $C_4$ . Les expériences avec des éléments marqués ont montré que les deux atomes de C de l'acide acétique et les quatre atomes de C de l'acide butyrique dérivent en partie du  $CO_2$  [30]. La fermentation du lactate peut être représentée schématiquement par les équations suivantes :



L'examen de ces équations montre que la décomposition du lactate (équation 38a) par cet organisme ne peut pas avoir lieu sans que le  $CO_2$  fonctionne comme oxydant (équation 38b). Dans l'oxydation du lactate, les équivalents de l'H sont formés en nombre plus grand qu'ils ne peuvent être utilisés dans la réduction d'une molécule d'acétate en butyrate (équation 38c). Contrairement aux *Clostridium*, qui provoquent les fermentations donnant de l'acide butyrique, le *B. rettgeri* ne possède pas de mécanisme lui permettant d'éliminer H sous forme de gaz.

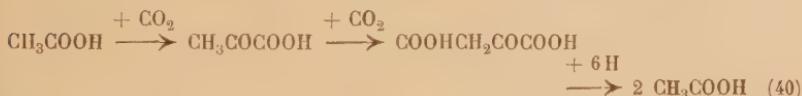
*Diplococcus glycinophilus* est un anaérobie obligatoire qui tire l'énergie qui lui est nécessaire de la fermentation de la glycine (équation 39) :



Le processus pourrait être interprété, en l'absence d'autres renseignements, comme une oxydation d'une molécule de glycine qui serait transformée en  $CO_2$  et  $NH_3$ , couplée avec une réduction de 3 mol. de glycine en ammoniaque et acide acétique. Cependant, la méthode des éléments marqués [32] montre que les choses sont plus compliquées qu'on ne l'avait pensé tout d'abord. Ce n'est pas le lieu ici de décrire toutes les expériences avec des éléments marqués qui ont été faites sur l'attaque de la glycine. Je dirai

seulement que les expériences ont montré que l'acide acétique formé dans cette fermentation est dérivé du  $\text{CO}_2$ . Dans ce cas, il entre plus de  $\text{CO}_2$  dans le groupe carboxyle que dans le groupe méthyle. Des expériences quantitatives ont révélé qu'au moins 6 p. 100 du carbone du méthyle et 35 p. 100 du carboxyle prennent naissance dans le  $\text{CO}_2$ . La signification de cette répartition n'est pas encore claire.

On a montré que l'incorporation du  $\text{CO}_2$  dans l'acide acétique ne peut pas se faire par les réactions suivantes :



Ce mécanisme implique que le C du carboxyle de l'acide acétique de départ est converti en C méthyle de l'acide acétique final. Les expériences avec des éléments marqués, dans lesquelles la glycine était fermentée en présence d'un carboxyle marqué, ont montré que la chose ne se produit que sur une échelle insignifiante.

Les observations faites jusqu'ici montrent qu'au moins 5 types de bactéries anaérobies appartenant à 3 genres différents sont capables de synthétiser l'acide acétique à partir du  $\text{CO}_2$ . Certaines de ces bactéries, en particulier *C. aceticum* et *C. thermoaceticum*, semblent utiliser  $\text{CO}_2$  comme seul oxydant pour obtenir l'énergie de leur métabolisme. Il est possible que le  $\text{CO}_2$  joue un rôle aussi important dans le métabolisme de *D. glycinophilus* et *C. acidurici*. Cependant, actuellement, les réactions impliquées dans la décomposition de la glycine et des purines sont si mal connues qu'il serait prématuré de tirer des conclusions des résultats acquis. Dans le métabolisme du lactate par *B. rettgeri*, il est évident que la réduction du  $\text{CO}_2$  s'accompagne d'un autre mécanisme oxydant : la réduction de l'acide acétique en acide butyrique. Il est probable que dans l'avenir on trouvera de nombreuses autres bactéries capables d'utiliser  $\text{CO}_2$ , soit comme oxydant principal, soit comme supplément dans leurs mécanismes oxydants. De nombreuses recherches sont encore nécessaires avant que la signification réelle de l'utilisation du  $\text{CO}_2$  et de la synthèse de l'acide acétique dans le métabolisme des bactéries anaérobies soit complètement élucidée.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARKER (H. A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1936, **7**, 404.
- [2] BARKER (H. A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1936, **7**, 420.
- [3] BARKER (H. A.), RUBEN (S.) et KAMEN (M. D.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1940, **26**, 426.

- [4] BARKER (H. A.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1940, **6**, 201.
- [5] BARKER (H. A.). *J. biol. Chem.*, 1941, **437**, 153.
- [5 a] BUSWELL (A. M.) et NEAVE (S. L.). *Illinois State Water Survey*, Bulletin n° 30, 1930.
- [6] BUSWELL (A. M.) et SOLLO (F. W.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **70**, 1778.
- [7] COOLHAAS (C.). *Zentralbl. Bakt. II*, 1928, **75**, 161.
- [8] FISCHER (F.), LIESKE (R.) et WINZER (K.). *Biochem. Zeitschr.*, 1932, **245**, 2.
- [9] FISCHER (F.), LIESKE (R.) et WINZER (K.). *Biochem. Zeitschr.*, 1931, **236**, 247.
- [10] HOPPE-SEYLER (F.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1886, **40**, 401.
- [11] GROENEWEGE (J.). *Med. Burg. Geneesk. Dienst*, 1920, **4**, 66.
- [12] KLUYVER (A. J.) et SCHNELLEN (C. G. T. P.). *Arch. Biochem.*, 1947, **14**, 57.
- [13] MAZÉ (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1903, **437**, 887.
- [14] MAZÉ (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1915, **78**, 398.
- [15] OMELIANSKI (W.). *Ces Annales*, 1916, **30**, 56.
- [16] SCHNELLEN (C. G. T. P.). *Dissertation, Delft*, 1947.
- [17] SÖHNGEN (N. L.). *Dissertation, Delft*, 1906 ; *Rec. trav. Chim. Pays-Bas*, 1910, **29**, 238.
- [18] STADTMAN (Thressa C.) [non publié].
- [19] STADTMAN (Thressa C.) et BARKER (H. A.). *Arch. Biochem.*, 1949 (sous presse).
- [20] STEPHENSON (M.) et STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1517.
- [21] SYMONS (G. E.) et BUSWELL (A. M.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1933, **55**, 2028.
- [22] TARVIN (D.) et BUSWELL (A. M.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 1751.
- [23] THAYER (L. A.). *Bull. Am. Assoc. Petroleum Geologists*, 1931, **15**, 441.
- [24] WIKEN (T.). *Arch. Mikrobiol.*, 1940, **41**, 312.
- [25] BARKER (H. A.). *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1944, **30**, 88.
- [26] BARKER (H. A.) et BECK (J. V.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 291 ; *J. biol. Chem.*, 1941, **141**, 3.
- [27] BARKER (H. A.) et ELSDEN (S. R.). *J. biol. Chem.*, 1947, **167**, 619.
- [28] BARKER (H. A.) et HAAS. *J. Bact.*, 1944, **47**, 301.
- [29] BARKER (H. A.) et KAMEN (M. D.). *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1945, **31**, 219.
- [30] BARKER (H. A.), KAMEN (M. D.) et HAAS (V.). *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1945, **31**, 355.
- [31] BARKER (H. A.), RUBEN (S.) et BECK (J. V.). *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1940, **26**, 477.
- [32] BARKER (H. A.), VOLCANI (B. E.) et CARDON (B. P.). *J. biol. Chem.*, 1948, **173**, 803.
- [33] CARDON (B. P.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 629 ; *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 165.
- [34] FONTAINE (F. E.), PETERSON (W. H.), MCCOY (E.), JOHNSON (M. J.) et RITTER (G. J.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 701.
- [35] KARLSSON (J. L.) et BARKER (H. A.). *J. biol. Chem.*, 1949 (sous presse).

- [36] KARLSSON (J. L.), VOLCANI (B. E.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 781.
- [37] KREBS (H. A.). *Ann. Rev. Biochem.*, 1943, **12**, 529.
- [38] WERKMAN (C. H.) et WOOD (H. G.). *Adv. in Enzymology*, 1942, **2**, 135.
- [39] WIERINGA (K. T.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1936, **3**, 1 ; 1939-1940, **6**, 251.
- [40] WOOD (H. G.). *Physiological Reviews*, 1946, **26**, 198.
- [41] WOOD (H. G.) et WERKMAN (C. H.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 48.

LES  
LÉCITHINASES, COLLAGENASES ET HYALURONIDASES  
DE LA SÉRIE CLOSTRIDIENNE TELLURIQUE

par C. L. OAKLEY, M. D.

(*Wellcome Research Laboratories, Beckenham, Kent, England.*)

Les lécithinases du genre *Clostridium* qui ont été soumises à l'épreuve biochimique sont toutes des lécithinases D ; elles détruisent la lécithine en la convertissant en phosphorylcholine et stéaryloléylglycéride (Macfarlane et Knight, 1941). Elles possèdent par conséquent un pouvoir toxique ; si elles existent dans les filtrats en concentration suffisante, elles tuent les animaux injectés par voie intraveineuse ou par voie sous-cutanée ; elles hémolysent les globules rouges de certaines espèces animales, elles provoquent des lésions nécrotiques locales après injection intracutanée ; elles troublent les émulsions de jaune d'œuf, la lécithovitelline de Macfarlane (Oakley et Anderson, 1941) et le sérum humain. Le trouble d'émulsions de jaune d'œuf est, comme l'hémolyse, un effet secondaire : la stabilité des émulsions des lipoïdes du jaune d'œuf dépend de la présence de la lécithine : et quand la lécithine a été détruite par l'enzyme, les autres lipoïdes du jaune d'œuf ou du sérum humain se précipitent. Le fait que l'action des lécithinases sur la lécithine dégage de la phosphorylcholine et que la phosphorylcholine décompose le bicarbonate de soude avec dégagement de  $\text{CO}_2$ , a été utilisé par Zamecnik et ses collaborateurs dans sa belle méthode manométrique pour le titrage des lécithinases. Il est possible que les lécithinases du genre *Clostridium* attaquent aussi les composés lécithoprotéiniques, comme le fait par exemple la lécithinase de *B. cereus*.

Les lécithinases sont produites par de nombreuses espèces du genre *Clostridium* : par *Cl. welchii* (tous les types), par *Cl. ordalii* types A et B, par *Cl. haemolyticum* (Oakley, Warrack et Clark, 1947 ; Jasmin, 1947), par *Cl. bifermentans*, par *Cl. sordelli*, par *Cl. centrosporogenes*, *Cl. sporogenes*, *Cl. chauvoei* et *Cl. tertium* (Crook, 1942 ; Macfarlane, 1948). Les cinq premières espèces sont les seules qui sont complètement étudiées : des autres on ne connaît que la production du trouble des émulsions de jaune d'œuf sans épreuve biochimique.

Il y a des différences fort marquées entre les lécithinases des

espèces du genre *Clostridium*. En dehors de la lécithine, la lécithinase de *Cl. welchii* décompose aussi, mais beaucoup plus lentement la sphingomyéline ; la lécithinase de *Cl. bif fermentans* attaque la lécithine et la céphaline. Les lécithinases de *Cl. welchii* et de *Cl. œdematiens* par exemple exigent la présence de calcium ionisé pour exercer leur activité enzymatique (Macfarlane, Oakley et Anderson, 1941 ; Oakley et Warrack, 1941 ; Oakley, Warrack et Clarke, 1947 ; Macfarlane, 1948), la lécithinase de *Cl. bif fermentans* n'en exige pas (Miles et Miles, 1947). La lécithinase  $\alpha$  de *Cl. welchii* hémolyse les globules rouges du mouton, mais pas ceux du cheval, la lécithinase  $\beta$  de *Cl. œdematiens* type B hémolyse les globules rouges du mouton et également ceux du cheval ; la lécithinase  $\gamma$  de *Cl. œdematiens* type A hémolyse les globules rouges du cheval plus que ceux du mouton. Ces faits soulèvent des problèmes très importants sur les actions enzymatiques.

Il existe des rapports antigéniques entre certaines de ces lécithinases. Les travaux de Miles et Miles (1947) ont montré des rapports antigéniques entre la lécithinase  $\alpha$  de *Cl. welchii* et celle de *Cl. bif fermentans* ; la lécithinase de *Cl. hæmolyticum* est un antigène identique à la lécithinase  $\beta$  de *Cl. œdematiens* type B (Oakley, Warrack et Clarke, 1947).

Nous décrirons ici nos expériences sur la lécithinase de *Cl. œdematiens* type A. Les filtrats des cultures de cet organisme troublent la lécithovitelline et hémolysent les globulés rouges du cheval. Quand on titre les sérum anti-*œdematiens* vis-à-vis des différents filtrats de *Cl. œdematiens* type A, on trouve, en employant la lécithovitelline comme indicateur, que les titres d'un sérum (par rapport à un sérum étalon) sont presque toujours différents de ceux qu'on obtient dans les épreuves mor-

TABLEAU I. — Titres des sérum vis-à-vis des filtrats de *Cl. œdematiens* type A, à l'épreuve mortelle et aux épreuves employant la lécithovitelline (L. V.) comme indicateur, en comparaison des titres vis-à-vis d'un filtrat de *Cl. welchii* type A.

SÉRUM	TITRE à l'épreuve mortelle	TITRE ANTI-L.V. CONTRE LE FILTRAT				TITRE anti- <i>perfringens</i> <i>alpha</i>
		AE 327	AE 51	AE 208	OC 193	
R 7903. . .	950	1.900	1.900	1.900	1.900	0,2
R 7548. . .	550	300	300	300	160	1
202 . . .	800	800	750	650	750	0,5
644. . .	800	900	700	700	500	5
9517. . .	1.700	1.000	900	900	700	0,1
171. . .	1,7	280	320	270		500
9583. . .		1.200	830	740	700	7

telles. La substance, ou les substances qui troublent la lécithovitelline ne sont pas les toxines mortelles.

Au contraire, la lécithinase de *Cl. welchii* type A, c'est la toxine mortelle. De plus, les titres du sérum ne sont pas constants. Par exemple : le titre du sérum R 7548 est 300 unités pour le filtrat AE 327, mais 160 unités pour le filtrat OC 193. L'explication la plus simple, c'est qu'il existe dans les filtrats deux substances qui troublent la lécithovitelline. Cette hypothèse est étayée par des expériences sur l'hémolyse.

TABLEAU II. — Titres des sérum vis-à-vis des filtrats de *Cl. ordematiens* type A. Comparaisons entre les épreuves L.V. et les épreuves hémolytiques.

SÉRUM	TITRE ANTI-HÉMOLYTIQUE contre		TITRE ANTI-L.V. contre	
	AE 327	OC 193	AE 327	OC 193
R 7903 . . . . .	1.800	1.700	1.900	1.700
202. . . . .	700	800	800	750
644. . . . .	1.000	850	800	500
471. . . . .	1.900		280	
9783 . . . . .	1.200	1.100	1.200	680
850 B. . . . .	780	800	340	460

On constate que les titres des sérum obtenus dans l'épreuve hémolytique sont souvent égaux à ceux qu'on obtient dans les

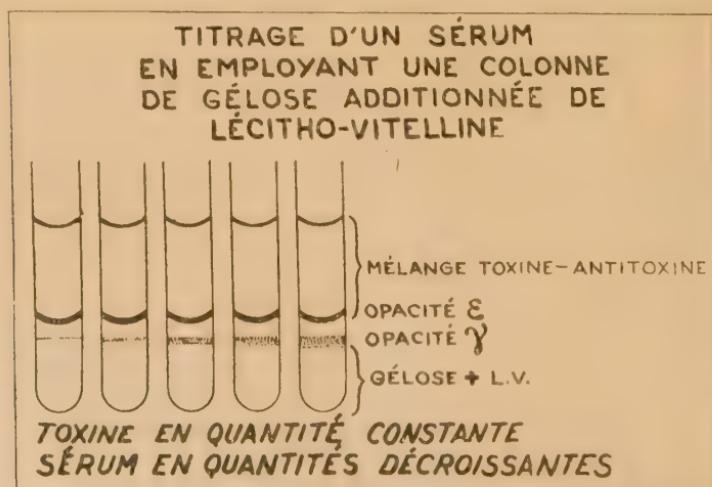


FIG. 1. Titrage des sérum vis-à-vis d'un filtrat de *Cl. ordematiens* type A, en employant des colonnes de gélose additionnée de lécithovitelline.

épreuves avec la lécithovitelline ; mais ils sont souvent très différents. Il est probable que nous avons dans les filtrats deux substances : l'une qui hémolyse les globules rouges et trouble la lécithovitelline, une lécithinase, et une autre qui trouble la lécithovitelline mais n'hémolyse pas. Nous avons pu séparer les activités de ces deux antigènes.

Si on laisse se former dans un tube à essai une colonne de gélose dissoute à 1 p. 100 dans le bouillon Vf additionné d'émulsion de jaune d'oeuf à 5 p. 100, et qu'on verse sur cette colonne solidifiée une certaine quantité du filtrat de *Cl. oedematiens* type A on constate, après incubation convenable à 37° C, deux zones de trouble de la colonne ; l'une à la surface de la gélose et, séparée d'elle par une zone claire, une autre zone de trouble. Si on emploie la seconde zone comme indicateur, on trouve que les titres des sérum vis-à-vis des filtrats de *Cl. oedematiens* type A sont égaux à ceux obtenus dans les épreuves hémolytiques.

TABLEAU III. — Titres des sérum vis-à-vis d'un filtrat de *Cl. oedematiens* type A, en employant les épreuves L.V. et hémolytique, et les épreuves avec une colonne de gélose additionnée de lécithovitelline.

SÉRUM	TITRE DES SÉRUMS EN EMPLOYANT COMME INDICATEUR		
	La lécithovitelline	Les globules rouges du cheval	Les colonnes de gélose additionnée de la lécithovitelline
R 7903 . . . . .	1.700	1.700	1.700
R 7548 . . . . .	160	300	310
850 B . . . . .	160	800	900
9539 . . . . .	350	400	400
644. . . . .	500	850	850
645. . . . .	500	800	750
9783 . . . . .	700	1.100	1.200
202. . . . .	750	800	800

Le trouble inférieur est dû à la lécithinase  $\gamma$  : le trouble supérieur à l'enzyme qui trouble la lécithovitelline, mais ne l'hémolyse pas ; d'après Oakley, Warrack et Clarke (1947), cet enzyme doit produire la couche perlée caractéristique des cultures de *Cl. oedematiens* du type A sur les milieux solides additionnés de la lécithovitelline ; d'après Macfarlane (1948) cet enzyme doit être une lipase.

Les lécithinases de *Cl. oedematiens* types A et B sont différentes entre elles et différentes de la toxine mortelle. On voit, d'après le tableau IV, que la lécithinase du type B possède les pouvoirs hémolytiques et nécrosants.

TABLEAU IV. — Titres des sérum vis-à-vis d'un filtrat de *Cl. œdematiens*, type B; les titres obtenus en employant la lécithovitelline comme indicateur sont comparés avec ceux obtenus par les épreuves mortelles, avec les titres anti-γ et les titres anti-*welchii* α.

SÉRUM	TITRE anti- <i>œdematiens</i>	TITRE anti-B (L.V.)	TITRE anti-γ	TITRE anti- <i>perfringens</i>
EX 949 . . . . .	1.200	230	50	1
2705 . . . . .	1.650	200	3	50
T 61 . . . . .	1.650	430	120	10
2209 . . . . .	1.675	240	42	70
850 A . . . . .	1.750	1.200	750	30
T 3 . . . . .	6.250	2.150	120	65

Quant aux collagénases, elles sont produites par trois espèces seulement du genre *Clostridium*: *Cl. welchii* [types A, C, E et souvent D] (Oakley, Warrack et Warren, 1948), par *Cl. histolyticum*, et peut-être par *Cl. lentoputrescens* (Jennison, 1945, 1947). Nous avons décrit trois indicateurs pour les collagénases: muscle frais de cobaye, papier de collagène (Oakley, Warrack et Van Heyningen, 1946) et azocoll. Les collagénases vraies amollissent le muscle frais, elles dissolvent le papier de collagène, elles décolorent l'azocoll. Les titres déterminés pour les sérum vis-à-vis des filtrats de *Cl. welchii* type A en employant les trois indicateurs sont égaux.

TABLEAU V. — Titres des sérum vis-à-vis d'un filtrat de *Cl. œdematiens* type B; titres obtenus en employant les épreuves L.V., hémolytiques, nécrosantes.

SÉRUM	TITRE ANTI-ŒDEMATIOIS B.		
	Épreuve L.V.	Épreuve hémolytique	Épreuve sur la peau
EX 949 . . . . .	230	230	230
T 61 . . . . .	450	300	350
T 3 . . . . .	2.500	2.000	2.200
2209 . . . . .	250	230	300
850 A . . . . .	1.400	1.100	1.300

Le papier de collagène est l'indicateur le plus spécifique, surtout quand il est préparé selon la méthode de Delaunay, Guillaunie et Delaunay (1949); l'azocoll est attaqué sans difficulté par les enzymes qui n'attaquent pas le collagène. Si l'on emploie

l'azocoll comme indicateur, les épreuves négatives sont la preuve de l'absence des collagénases ; les résultats positifs ne peuvent être obtenus qu'avec des indicateurs plus spécifiques (Oakley, Warrack et Warren, 1948 ; Todd, 1947).

Il est facile de prouver par ces méthodes que la collagénase de *Cl. welchii* diffère des antigènes  $\alpha$ ,  $\beta$  et de l'hyaluronidase de cet organisme (Oakley, Warrack et Van Heyningen, 1946) et que

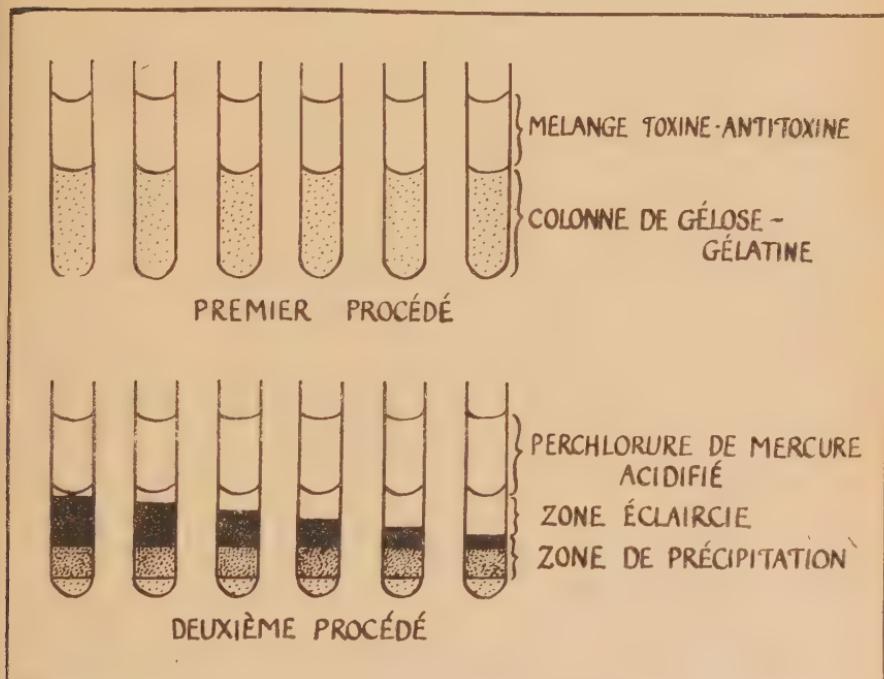


FIG. 2. — Titrage des sérums antigélatinasiques.

la collagénase de *Cl. histolyticum* diffère de la toxine mortelle. Il est possible aussi de montrer que la collagénase de *Cl. welchii* attaque la gélatine (Oakley, Warrack et Warren, 1948).

On laisse se former une colonne de gélose à 1 p. 100 additionnée de gélatine à 0,04 p. 100 ; on verse sur la colonne solide une certaine quantité de filtrat contenant de la collagénase. Après un temps convenable, on laisse s'écouler le liquide et on le remplace par une solution de perchlorure de mercure acidifié avec de l'acide chlorhydrique. Si la gélatine a été détruite, la surface de la colonne reste claire, et la précipitation ne se fait que dans la profondeur de la colonne ; si la gélatine n'est pas attaquée, la précipitation se fait à la surface de la colonne et s'étend vers

la profondeur. On peut utiliser cet indicateur pour titrer les sérums au point de vue de leur pouvoir antigélatinase vis-à-vis des filtrats de *Cl. welchii* type A ; on trouve que les titres sont égaux aux titres anticollagénasiques.

TABLEAU VI. — **Titres des sérums contre un filtrat de *Cl. welchii* type A en employant les trois indicateurs pour la collagénase.**

SÉRUM	TITRE ANTI-COLLAGÉNASIQUE en utilisant comme indicateur		
	Muscle frais	Papier de collagène	Azocoll
R 8531 . . . . .	180	180	180
R 5434 . . . . .	50	58	55
A 16836 . . . . .	110	100	105
A 24422 . . . . .	180	170	170
R 1843 . . . . .	330	350	300
H 3296 . . . . .	500	600	400

La collagénase de *Cl. welchii* type A est aussi une gélatinase.

Les hyaluronidases étudiées jusqu'ici sont produites par *Cl. welchii*, *Cl. septicum* et *Cl. œdematiens* (McClean et Rogers, 1943 ; McClean, Rogers, Williams et Hale, 1943). On peut les titrer par leur capacité de diffuser dans la peau, de prévenir la production d'un caillot de mucine, de prévenir la production de trouble d'un mélange d'acide hyaluronique et d'albumine acidifiée, par la méthode ACRA de Burnet (1948), par les changements physiques et biochimiques qu'elles produisent dans les solutions d'acide hyaluronique. Nous avons trouvé que la méthode ACRA est celle qui possède la plus grande exactitude pour le titrage des hyaluronidases et des sérums antihyaluronidases. On mélange le filtrat et le sérum en proportions convenables, on le laisse reposer pendant une demi-heure, on ajoute l'acide hyaluronique (soit sous forme d'acide pur, soit sous forme de liquide synovial de cheval), on mélange et on laisse reposer le mélange pendant une heure au bain-marie à 37° C. Après cela, on retire les mélanges du bain-marie, on leur ajoute une quantité constante d'une solution de rouge Congo, et on les refroidit dans l'eau glacée. Quand ils sont froids, on en laisse tomber quelques gouttes dans l'alcool acidifié. S'il reste de l'acide hyaluronique, la goutte se reforme en globule bleu ; si l'acide hyaluronique a été détruit, la goutte diffuse dans l'alcool acidifié. Les hyaluronidases de *Cl. welchii*, de *Cl. septicum* et *Cl. œdematiens* sont des antigènes différents (McClean et Hale, 1941).

Considérons enfin l'importance des enzymes dans la pratique. On peut les utiliser pour déterminer les espèces, soit en laissant celles-ci pousser sur les milieux contenant de la lécithovitelline, du collagène ou l'acide hyaluronique, additionnés ou non de l'antitoxine spécifique, soit en recherchant les enzymes dans les filtrats de culture (Hayward, 1943, 1945 ; Hayward et Gray, 1947). On peut rechercher dans les exsudats des plaies les lécithinases et les hyaluronidases des germes anaérobies, pour déterminer les organismes qui ont produit les lésions (McClean, Rogers, William et Hale, 1943). Il est possible aussi que les enzymes que nous avons décrits jouent un grand rôle dans les infections gazeuses. Les lécithinases produisent des foyers nécrotiques locaux dans lesquels les organismes peuvent pousser ; les collagénases détruisent le collagène et la réticuline des tissus et, de cette façon, ils détruisent les obstacles à l'extension de la maladie : les hyaluronidases peuvent aider à l'extension de la maladie par leur pouvoir diffusant, en détruisant l'acide hyaluronique. Il est possible que la destruction des cadavres d'animaux soit accélérée par l'action de lécithinases, de collagénase et d'hyaluronidases qui détruisent les obstacles naturels et facilitent l'entrée d'autres bactéries décomposantes. Il est certain, d'après les expériences de McClean et Rogers (1943), que les infections par les *Cl. welchii* dépourvus d'hyaluronidases sont plus limitées que celles dues aux *Cl. welchii* qui sécrètent de l'hyaluronidase ; et que l'addition d'hyaluronidase aux cultures des *Cl. welchii* qui n'en sécrètent pas, leur confère le pouvoir de produire une infection bien plus étendue que celle qu'ils produiraient sans addition d'hyaluronidase. Mais Evans (1945, 1947) a constaté que le pouvoir infectieux de *Cl. welchii* pour le cobaye ne dépend que de la lécithinase  $\alpha$  ; pour lui, la collagénase et l'hyaluronidase ne jouent pas de rôle important dans les infections déterminées par cet organisme. Mais si on se souvient des observations de MacFarlane et MacLennan (1945), qui étaient convaincus que les propriétés de la toxine  $\alpha$  ne pouvaient expliquer qu'une partie de la clinique si complexe de la gangrène gazeuse déterminée par *Cl. welchii*, on doit être certain que le dernier mot sur ces questions n'a pas encore été dit.

#### BIBLIOGRAPHIE

BURNET (F. M.). *Austral. J. exp. Biol. Med.*, 1948, **26**, 71.  
 CROOK (E. M.). *Brit. J. exp. Path.*, 1942, **23**, 37.  
 DELAUNAY (M.), GUILLAUMIE (M.) et DELAUNAY (A.). *Ces Annales*, 1949, **76**, 16.  
 EVANS (D. G.). *J. Path. a. Bact.*, 1945, **55**, 427.  
 EVANS (D. G.). *Brit. J. exp. Path.*, 1947, **28**, 30.  
 HAYWARD (N. J.). *J. Path. a. Bact.*, 1943, **55**, 285.

HAYWARD (N. J.). *Proceed. Assoc. Clin. Path.*, juillet 1945, p. 5.  
HAYWARD (N. J.) et GRAY (J. D. A.). *J. Path. a. Bact.*, 1946, **58**, 11.  
JASMIN (A. M.). *Am. J. Vet. Res.*, 1947, **8**, 289.  
JENNISON (M. W.). *J. Bact.*, 1945, **50**, 369.  
JENNISON (M. W.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 55.  
MCLEAN (D.) et HALE (C. W.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 159.  
MCLEAN (D.) et ROGERS (H. J.). *Lancet*, 1943, **1**, 707.  
MCLEAN (D.), ROGERS (R. J.), WILLIAMS (B. W.) et HALE (C. W.).  
*Lancet*, 1943, **1**, 355.  
MACFARLANE (M. G.). *Biochem. J.*, 1948, **42**, 590.  
MACFARLANE (M. G.) et KNIGHT (B. C. J. G.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 844.  
MACFARLANE (R. G.) et MACLENNAN (J. D.). *Lancet*, 1945, **2**, 328.  
MACFARLANE (R. G.), OAKLEY (C. L.) et ANDERSON (C. G.). *J. Path. a.  
Bact.*, 1941, **53**.  
MILES (E. M.) et MILES (A. A.). *J. Gen. Microbiol.*, 1947, **1**, 385.  
OAKLEY (C. L.) et WARRACK (G. H.). *J. Path. a. Bact.*, 1941, **53**, 335.  
OAKLEY (C. L.), WARRACK (G. H.) et CLARKE (P. H.). *J. Gen. Microbiol.*,  
1947, **1**, 91.  
OAKLEY (C. L.), WARRACK (G. H.) et WARREN (M. E.). *J. Path. a. Bact.*,  
1948, **60**, 495.  
OAKLEY (C. L.), WARRACK (G. H.) et VAN HEYNINGEN (W. E.). *J. Path.  
a. Bact.*, 1946, **58**, 229.  
TODD (E. W.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 591.

## RÉDUCTION DES NITRATES ET ANAÉROBIOSE

par JANE MEIKLEJOHN.

(*Rothamsted Experimental Station.*)

La réduction des nitrates est une des réactions les plus fréquemment observées et en même temps une des moins bien connues, effectuées par les bactéries. D'une part, une quantité de tests courants pour la recherche du pouvoir réducteur ont été réalisés sur presque chacune des souches qui ont été isolées ; d'autre part, il existe de nombreux travaux sur la dénitrification du sol qui ignorent ou qui ne décrivent pas exactement les bactéries qui effectuent cette dénitrification. Il existe très peu de recherches sur le mécanisme de la réduction des nitrates, soit en culture pure de bactéries, soit dans les milieux naturels. Si l'on considère les connaissances actuellement acquises, celles-ci semblent former un ensemble bien désini ; mais cet ensemble est incomplet et il serait très possible qu'il ne corresponde pas à ce qui existe en réalité dans la nature. Je vais cependant le soumettre à votre examen. Je dois peut-être tout d'abord signaler que je suis spécialisée dans l'étude de la microbiologie du sol et que la question de la réduction des nitrates m'intéresse surtout en tant que partie du cycle de l'azote dans le sol.

LES PRODUITS DE LA RÉDUCTION DES NITRATES. — Les produits de la réduction des nitrates qui ont été décrits sont les suivants :

- 1<sup>o</sup> Nitrites,  $\text{HNO}_2$  ;
- 2<sup>o</sup> Oxydes d'azote, en particulier  $\text{N}_2\text{O}$  ;
- 3<sup>o</sup> Hydroxylamine,  $\text{NH}_2\text{OH}$  ;
- 4<sup>o</sup> Azote,  $\text{N}_2$  ;
- 5<sup>o</sup> Ammoniaque,  $\text{NH}_3$ .

Parmi ces produits, les deux derniers, l'azote et l'ammoniaque, jouent un rôle important dans le cycle de l'azote, et c'est d'eux que je m'occuperai principalement.

BACTÉRIES QUI NE RÉDUISENT PAS LES NITRATES. — Il y a de nombreuses bactéries qui ne réduisent pas du tout les nitrates; bien qu'elles soient capables d'utiliser l'azote des nitrates pour leur développement. Au cours de l'étude de 80 souches aérobies isolées d'eaux usées d'usine (Meiklejohn, 1935), j'ai trouvé

13 souches qui ne réduisaient pas les nitrates. Prévot (1940) a montré que plusieurs anaérobies stricts, par exemple *Clostridium sporogenes*, soustraient les nitrates au milieu, bien qu'ils ne les réduisent pas. Il est intéressant de constater qu'il y a des bactéries aérobies et des bactéries anaérobies strictes qui ne réduisent pas les nitrates. D'un côté nous avons des germes à métabolisme doué d'un fort pouvoir oxydant, comme *Acetobacter* et les bactéries nitrifiantes, de l'autre des anaérobies stricts, comme les streptocoques anaérobies, *Desulphovibrio* et *Methanobacterium* (Barker, 1941). Je reviendrai plus loin sur ce point.

**NITRITES ET ACIDE NITREUX.** — Les nitrites sont les produits le plus souvent décrits de la réduction des nitrates et ils semblent être en effet les produits les plus fréquemment rencontrés dans les cultures pures et être toujours le premier stade de la réduction. Dans l'étude que j'ai faite en 1935 (*loc. cit.*), j'ai constaté que 30 sur 80 de mes anaérobies réduisaient tous les nitrates en nitrites dans un milieu synthétique et que 29 autres souches donnaient quelques nitrites correspondant à 2 à 50 p. 100 des nitrates fournis. Mentionnons, comme l'a signalé Conn (1936), que le test nitrite peut induire en erreur s'il est utilisé comme seule indication du pouvoir réducteur des bactéries. Si une bactérie réduit les nitrates très rapidement au delà du stade nitrite, elle peut être décrite comme non réductrice si l'on ne recherche que les nitrites et si l'on ne parle pas de l'ammoniaque, de la perte de l'azote total ou de la disparition des nitrates. Mais, même si l'on tient compte d'erreurs de cette sorte, il est évident qu'un grand nombre d'aérobies, d'anaérobies facultatifs et d'anaérobies stricts réduisent les nitrates en nitrites.

Il semble y avoir au moins deux systèmes enzymatiques distincts qui effectuent cette réduction : la nitratase d'*E. coli* (Quastel, Stephenson et Whetham, 1925), que Stickland (1931) décrivit comme très sensible à l'oxygène, étant légèrement inhibée par 0,36 p. 100 d'oxygène, et inhibée pour 94 p. 100 dans l'air (contenant 20,9 p. 100 d'oxygène) ; puis l'enzyme réducteur des bactéries dénitritifiantes, qui n'est pas sensible à l'oxygène. J'ai constaté (Meiklejohn, 1940) que deux souches de *Pseudomonas* dénitritifiantes réduisaient les nitrates en nitrites (puis en azote) dans une mince couche de milieu liquide à travers laquelle on faisait barboter de l'air, et Korsakowa (1941) a également décrit la dénitritification en aérobiose.

Dans les solutions acides, les bactéries peuvent être intoxiquées par les nitrites qu'elles forment elles-mêmes. Karlsen (1938) a constaté que *Pseudomonas aeruginosa* réduisait rapidement les nitrites en azote en milieu alcalin (pH optimum 8,1 à 8,6), mais

qu'en solution acide, les nitrites avaient une action toxique proportionnelle à leur concentration. J'ai observé (Meiklejohn, 1940) que mes souches de *Pseudomonas* réduisaient rapidement les nitrites en azote à pH 8, mais qu'à pH 6,9 elles étaient intoxiquées par les nitrites; même en présence d'une quantité de nitrates suffisante pour leur croissance. Tarr (1941) a décrit un fait semblable chez 12 espèces comprenant *E. coli* et une *Pseudomonas*. Huntington et Rahn (1945) considèrent que l'acide nitreux est un des nombreux acides faibles qui sont toxiques en solution acide seulement : l'acide non dissocié est toxique, mais l'ion nitrite est inoffensif.

Les nitrites ne s'accumulent pas normalement dans le sol et, dans les conditions naturelles, leur réduction se continue certainement.

**OXYDES D'AZOTE ET HYDROXYLAMINE.** — D'après Beijerinck et Minkman (1910), l'oxyde nitreux,  $N_2O$ , est formé au cours de la réduction des nitrates par différents organismes du sol, y compris *Micrococcus denitrificans*. Mais les concentrations de nitrates que ces auteurs ont employées sont si élevées (jusqu'à 12 p. 100) que je ne peux pas croire que ce produit soit réellement formé dans la nature.

L'hydroxylamine a été décrite comme un produit de réduction par Blom (1928) et par Lindsey et Rhines (1932), mais elle est trop instable pour apparaître autrement que d'une façon transitoire dans les conditions naturelles. Woods (1938) considère que l'hydroxylamine est probablement formée comme produit intermédiaire dans la réduction des nitrates en ammoniaque par *Cl. welchii*.

**AZOTE.** — La réduction des nitrates en azote gazeux est la dénitrification au sens strict. C'est une importante réaction dans la nature, car c'est le seul processus qui provoque une perte de l'azote du sol, le gaz s'échappant dans l'atmosphère. Il faut dire tout de suite que cette réaction n'est pas effectuée par les anaérobies stricts. Les bactéries dénitritifiantes qui ont été décrites sont toutes des anaérobies facultatives et, comme je l'ai dit plus haut, j'ai constaté (Meiklejohn, 1940) que la réduction en azote peut avoir lieu en aérobiose. Korsakowa est arrivée aux mêmes résultats (1941). Il semble certain que les nitrites sont les premiers produits de la réduction, mais la suite du mécanisme : réduction en azote, est inconnue. On a avancé que les nitrites réagissaient avec l'ammoniaque ou les groupes aminés (réaction de Van Slyke) ; mais cette réaction n'a lieu qu'en solution acide, et la dénitrification en solution neutre ou alcaline seulement, parce qu'en solu-

tion acide les bactéries sont intoxiquées par les nitrites et la réaction s'arrête au stade nitrite.

Les bactéries dénitritifiantes exigent la présence d'un composé organique agissant comme donneur d'hydrogène pour la réduction des nitrates. Un grand nombre de ces composés peuvent être employés (Beijerinck et Minkman, 1910). Mes deux micro-organismes dénitritifiantes peuvent utiliser le lactate, citrate, fumarate et glycérol ; l'un pouvait utiliser le glucose et la saccharose, mais pas l'alcool éthylique ou l'acétate, et l'autre pouvait utiliser l'alcool éthylique et le galactose, mais pas le glucose, le saccharose ou le malate. Il est peu probable que les bactéries dénitritifiantes puissent utiliser l'hydrogène moléculaire pour réduire les nitrates, car Stephenson et Stickland (1931) ont montré qu'un organisme devait posséder une hydrogénase pour être capable d'utiliser l'hydrogène moléculaire, et ils ont également montré que *Pseudomonas aeruginosa* (agent dénitritifiant, comme on le sait), ne possédait pas cet enzyme.

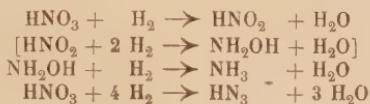
Les conditions essentielles à la dénitritification dans la nature sont une réaction faiblement alcaline (pH 8 environ) et la présence en quantité suffisante de composés organiques qui peuvent être utilisés comme donneurs d'hydrogène ; une anaérobiose stricte n'est pas essentielle.

**AMMONIAQUE.** — Quelques espèces seulement ont été décrites comme réduisant les nitrates en ammoniaque ; elles comprennent un aérobiose, *Azotobacter* (Stoklasa, 1908), un anaérobiose facultatif, *E. coli* (Aubel, 1938) et un anaérobiose strict, *Cl. welchii* (Woods, 1938) ; trois autres *Clostridia* du sol ont été décrits comme réduisant les nitrates ou les nitrites en ammoniaque (*Bergey's Manual*, 6<sup>e</sup> édit.).

Il est possible que d'autres bactéries réduisent les nitrates en ammoniaque et que ce fait ait passé inaperçu, soit parce que l'ammoniaque n'a pas été recherché, soit parce que ces bactéries étaient cultivées dans un milieu tel que le bouillon, qui contient d'autres sources d'ammoniaque. En particulier il semble probable, d'après les travaux de Woods, que si les anaérobioses stricts peuvent pousser la réduction au delà du stade nitrite, ils réduisent les nitrates en ammoniaque.

L'étude que Woods a faite de la réduction des nitrates par *Cl. welchii* est de la plus grande importance, car elle éclaire non seulement le mécanisme de la réduction des nitrates, mais aussi le rôle des anaérobioses stricts dans le cycle de l'azote du sol. Il a travaillé avec des suspensions du germe en tampon phosphate à pH 7,1 dans l'appareil de Warburg, et constaté que ces germes étaient capables de réduire les nitrates, les nitrites et l'hydroxylamine en ammoniaque en présence d'hydrogène moléculaire.

Les nitrites pouvaient être mis en évidence au cours des premiers stades de la réduction des nitrates et, par conséquent, sont certainement un intermédiaire. L'hydroxylamine ne put être décelée au cours de la réduction des nitrates ou des nitrites, mais elle est elle-même réduite en ammoniaque et est donc probablement un intermédiaire. L'hydrogène consommé et l'ammoniaque formé ont été mesurés et correspondaient aux équations :



Woods a attiré l'attention sur le fait que *Cl. welchii* était un anaérobiose commun du sol et il semble donc que l'ammoniaque soit formé dans le sol comme résultat de la réduction des nitrates par des anaérobies stricts ; comme ceux-ci peuvent utiliser l'hydrogène moléculaire, la présence d'un donneur d'hydrogène organique ne serait pas nécessaire. L'hydrogène est produit par un très grand nombre de bactéries, y compris *Cl. welchii* lui-même, à partir des hydrates de carbone et des acides aminés. L'ammoniaque formée pourrait être assimilée par d'autres bactéries ou par des plantes, ou bien elle pourrait être entraînée en solution dans une région plus aérobiose où elle serait oxydée par des bactéries nitrifiantes.

**INFLUENCE DU POTENTIEL D'OXYDO-RÉDUCTION.** — La différence essentielle entre aérobies et anaérobies consiste, comme on le sait, dans le fait que la croissance des anaérobies ne peut commencer qu'avec un potentiel d'oxydo-réduction peu élevé. J'inclinerais à penser que le facteur régissant la réduction des nitrates et les produits de la réduction dans la nature est le potentiel d'oxydo-réduction du milieu.

A une extrémité de l'échelle, nous avons les bactéries très aérobies, qui exigent un potentiel O. R. si élevé qu'elles ne peuvent pas du tout réduire les nitrates (par exemple, *Acetobacter* et les bactéries nitrifiantes) ; puis viennent les aérobies et les anaérobies facultatifs, qui réduisent les nitrates en nitrites. Mais là, les choses se compliquent, car Prévot (1940) a décrit un anaérobiose strict qui, en bouillon glucosé, réduit les nitrates, mais en nitrites seulement, et la souche d'*E. coli* de Stickland ne réduit les nitrates qu'en nitrites en présence d'hydrogène, bien que la souche utilisée par Woods (1938) puisse les réduire en ammoniaque.

Cependant, il semble certain que la dénitrisification (réduction en azote) puisse être effectuée à un potentiel O. R. relativement élevé. Mais la réduction en ammoniaque (qui est le produit le plus fortement réduit) doit exiger un potentiel O.R. bas, puisque

l'hydrogène moléculaire est utilisé. C'est cette réaction qui est probablement typique des anaérobies stricts. L'apparition dans le sol d'azote ou d'ammoniaque comme produit final de la réduction des nitrates est incontestablement régie par le potentiel O.R.

Enfin, à l'autre bout de l'échelle, il y aura les bactéries qui sont tellement anaérobies qu'elles ne peuvent pas activer les nitrates, par exemple *Methanobacterium omelianskii* (Barker, 1941).

#### BIBLIOGRAPHIE

MEIKLEJOHN. *Trans. Third Intern. Congr. Soil Sci.*, 1935, **4**, 180.  
 PRÉVOT. *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **144**, 350.  
 BARKER. *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 153.  
 CONN. *J. Bact.*, 1936, **31**, 225.  
 QUASTEL, STEPHENSON et WHETHAM. *Biochem. J.*, 1925, **19**, 304.  
 STICKLAND. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1543.  
 MEIKLEJOHN. *Ann. appl. Biol.*, 1940, **27**, 558.  
 KORSAKOWA. *Microbiologie*, 1941, **10**, 163.  
 KARLSEN. *Bergens Mus. Aarb.*, 1938, **2**.  
 TARR. *J. biol. Res. (Canada)*, 1941, **5**, 265.  
 HUNTINGTON et RAHN. *J. Bact.*, 1945, **50**, 655.  
 BEIJERINCK et MINKMAN. *Zentralbl. Bakt. II*, 1910, **25**, 30.  
 BLOM. *Biochem. Zeitschr.*, 1928, **194**, 392.  
 LINDSEY et RHINES. *J. Bact.*, 1932, **24**, 489.  
 WOODS. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 2000.  
 STEPHENSON et STICKLAND. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 205.  
 STOKLASA. *Zentralbl. Bakt. II*, 1908, **21**, 620.  
 AUBEL. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 45.  
 BERGEY et al. *Manual of Determinative Bacteriology*, 6<sup>e</sup> édit., 1948.  
 HEWITT. *Oxidation-reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry*, 5<sup>e</sup> édit., 1948.

## FERMENTATIONS ANAÉROBIES DANS LA NATURE

par JAN SMIT.

(*Wageningen. Hollande.*)

En parlant des fermentations anaérobies strictes on pourrait se demander si les conditions de développement des microbes fermentatifs sont bien réalisables dans la nature vivante, où l'oxygène libre joue un rôle si prépondérant.

Le professeur Buchanan, dans l'exposé qu'il a donné sur le rôle des anaérobies en agronomie, a déjà souligné qu'il y a deux possibilités pour effectuer la multiplication de ces organismes, soit :

1<sup>o</sup> Absence des dernières traces d'oxygène ;  
2<sup>o</sup> Une symbiose avec des organismes aérobies, qui les protègent contre l'influence funeste de ce gaz, en abaissant le potentiel d'oxydo-réduction.

J'en ajouterai une troisième : l'abaissement de ce potentiel qu'apportent certains composés chimiques : l'hydrogène sulfuré, l'acide thiolactique, l'acide ascorbique et tant d'autres. La possibilité d'un développement des anaérobies paraît donc liée à la valeur de ce potentiel et ne s'effectuer que si celui-ci se trouve au-dessous d'une valeur limite, correspondant à rH 14 environ.

En d'autres termes, si, par une mesure quelconque, nous parvenons à abaisser le potentiel, la condition d'un développement se présente.

Tandis qu'une application ancienne consistait en addition de morceaux de foie (le bouillon Tarozzi), les méthodes modernes emploient toutes sortes de substances pures et d'une valeur réductrice variable.

Il s'ensuit que la présence ou l'absence du gaz oxygène est un fait d'une importance pour ainsi dire secondaire, bien qu'il faille admettre que c'est en son absence qu'une valeur basse du potentiel s'effectue le plus facilement.

Bien des exemples instructifs de symbioses auxquelles un aérobie prend part se trouvent dans le domaine des fermentations anaérobies naturelles. Je citerai la fermentation butylique, qui se déclenche dans une pâte de farine de froment ou de seigle, préalablement chauffée à l'ébullition et tenue à 30° C. Tandis qu'à la surface il se développe des aérobies stricts du groupe de

*B. subtilis*, au-dessous il se produit une fermentation vive du *Cl. butylicum*, anaérobiose strict. De même la réduction des sulfates et la fermentation méthanique dans la nature ne peuvent s'effectuer que grâce à la symbiose avec des microbes aérobies.

Il faut en conclure que les fermentations anaérobies dans la nature ne dépendent pas de l'absence du gaz oxygène dans un sens aussi strict qu'on pourrait l'imaginer.

Or, on sait que dans chaque grain d'un terreau quelconque, quoique en libre contact avec l'atmosphère, il se trouve des anaérobies stricts en abondance, et ce fait ne s'expliquerait que difficilement s'il fallait admettre que dans la terre ces microbes ne trouvent pas moyen de se multiplier à cause de l'oxygène. Sans doute beaucoup d'entre eux s'y trouvent sous forme de bacilles sporulés ou de spores, mais il y a maintes espèces anaérobies qui n'en présentent pas et qui néanmoins conservent leur vitalité dans la terre de nos champs. En outre, cette terre, au contact des espèces bactériennes pures, paraît en prolonger la vie et en augmenter la résistance contre toutes sortes d'influences défavorables, comme la chaleur et les matières désinfectantes. Il faut en conclure, à mon avis, que dans la nature l'existence de circonstances favorables non seulement à la vie, mais aussi à la multiplication des anaérobies ne saurait être niée.

Cependant la plupart des fermentations anaérobies strictes dans la nature se réalisent à l'abri de l'oxygène, qui, contrairement à son influence sur les anaérobies facultatifs, se comporte envers les anaérobies stricts comme un véritable poison : l'oxygène ne peut être utilisé par ceux-ci comme accepteur d'hydrogène et le contact avec ce gaz les tue rapidement.

En passant en revue ces fermentations, j'aurais voulu mentionner en premier lieu la fermentation méthanique naturelle et vous parler des microbes qui la provoquent ainsi que des recherches de mes compatriotes Söhngen, Van Niel et Schnellen, mais M. Barker l'a déjà fait d'une manière si impressionnante, que je n'ai rien à y ajouter. Néanmoins, n'oublions pas cette fermentation particulière produisant du méthane, qui se réalise dans la panse des ruminants. Comme M. Buchanan l'a relevé, une quantité énorme de méthane se forme journallement, mais on n'en sait pas l'origine et cette fermentation mérite une recherche détaillée. Mais c'est la fermentation anaérobie de la cellulose qui constitue la réaction principale s'effectuant dans la panse. Jusqu'ici c'étaient les bacilles sporulés, décrits par Oméliansky, qui étaient le centre des recherches sur les processus cellulolysiques, mais des recherches récentes de M<sup>me</sup> Kaars Sijpesteijn, dans le laboratoire de Delft, ont confirmé les résultats obtenus par Hungate, c'est-à-dire que ce sont des micro-organismes anaérobies qui constituent les agents presque exclusifs de la dégradation de

la cellulose. Les acides acétique et propionique forment les principaux produits. En outre, M<sup>me</sup> Sijpesteijn a isolé en culture pure un streptocoque anaérobie, produisant de l'acide succinique et acétique, quand il attaque la cellulose en symbiose avec *Cl. sporogenes*, qui, lui-même, est sans action. Ces observations rendent probable l'interprétation que ces microbes anaérobies non sporulés sont beaucoup plus importants comme agents de la dégradation cellulolytique que les microbes sporulés, qu'on a maintes fois constatés dans le contenu de la panse, et ces derniers ne semblent remplir qu'une fonction accessoire et stimulatrice.

Mais la réduction de l'acide carbonique peut aussi donner lieu à la formation de l'acide acétique, selon la formule :



C'est mon collaborateur, le Dr Wieringa, qui a isolé et étudié le microbe causal, le *Cl. aceticum*, un *Clostridium* à grandes spores très résistantes, dont la fonction dans la nature n'a pas été élucidée jusqu'ici, mais dont on peut deviner l'activité dans des conditions anaérobies, où l'acide carbonique et l'hydrogène se développent.

Les recherches récentes sur les différentes espèces de *Clostridium* par M. Barker et ses collaborateurs ont démontré la diversité remarquable des dégradations effectuées par ces microbes.

Je citerai la transformation d'une molécule de glucose en trois molécules d'acide acétique, la fermentation des lactates, produisant de l'hydrogène et les acides butyrique et carbonique. Cette dernière dégradation exige la présence de l'acide acétique, sans lequel le lactate n'est pas attaqué. L'acide urique et quelques-uns de ses dérivés sont dégradés, formant les acides acétique et carbonique et de l'ammoniaque.

Un coup d'œil sur l'ensemble de ces fermentations révèle l'importance inattendue de l'acide acétique pour toutes sortes de dégradations naturelles.

Pour conclure, je voudrais attirer votre attention sur la fermentation gastrique, connue depuis le milieu du dix-neuvième siècle, se déclarant dans les cas de sténose du pylore. Par suite de ce barrage de la sortie de l'estomac, le contenu s'acidifie à un tel point (pH 1,5 environ) que seuls les microbes les plus acido-tolérants peuvent se développer. Parmi eux la sarcine anaérobie de l'estomac, la *Sarcina ventriculi*, domine et s'y trouve parfois à l'état presque pur. C'est mon maître, le professeur Beijerinck, qui, le premier, a cultivé ce microbe en culture pure en dehors de l'estomac, et des recherches ultérieures ont démontré que la fermentation gastrique, qui cause tant d'inconvénients aux patients infectés, est une fermentation alcoolique, comparable à celle de

la levure, sauf la formation d'un peu d'acide et d'hydrogène. On a trouvé ce microbe anaérobiose partout dans la nature, tant dans le terreau et le sable ordinaires que dans la boue des fossés et des eaux usées. Donc sa propagation dans la nature ne semble pas être entravée par le contact avec l'atmosphère, quoiqu'on n'ait jamais observé la formation de spores. Néanmoins, son ubiquité dans la nature aérobie suggère une résistance extrême contre des conditions défavorables. Or, cette qualité ne se réalise point quand on observe les cultures de cet organisme. En effet, les cultures du laboratoire, pures et impures, sont extrêmement délicates et meurent en deux ou trois jours après la fin de la fermentation, chose déjà remarquée par tous les savants qui, avant Beijerinck, ont tâché en vain d'isoler le microbe du contenu de l'estomac des patients. Au contraire, les matériaux naturels, aptes à dégager une fermentation sarcinique, comme le sable et la boue, conservent presque sans limite cette faculté.

Quand on tâche d'imiter les conditions naturelles, en introduisant les sarcines dans du suc gastrique, de la terre ou du sable stérilisés, secs ou humides, sans ou avec une atmosphère d'acide carbonique, le résultat est presque nul : les sarcines restent visibles mais elles ont perdu leur faculté de reproduction. Au contraire, dans le sable et la boue, portant les germes d'où les sarcines peuvent se développer, l'exploration microscopique la plus scrupuleuse ne révèle jamais la présence de sarcines et la conclusion semble inévitable, qu'elles s'y trouvent sous une forme autre que les paquets cubiques bien connus, qu'on ne trouve pas à l'examen microscopique, mais qui, dans des circonstances favorables, se transforment irréversiblement en des sarcines véritables, mourant après quelques jours, sans qu'elles aient eu l'occasion d'acquérir la résistance remarquable que possèdent les germes invisibles des matières naturelles.

Une deuxième forme de sarcine anaérobiose fermentative se trouve sur le blé. Si, afin d'éviter les vibrions butyriques, on prend, au lieu de la farine, le son de froment ou de seigle et qu'on le met à l'étuve dans une solution de sucre, acidifiée par l'acide chlorhydrique ou phosphorique jusqu'à pH 2 environ, une fermentation vive se déclare. Parfois les sarcines s'y trouvent à l'état presque pur. Elles ressemblent beaucoup à la *Sarcina ventriculi* par la taille, par la résistance envers les acides minéraux (tandis que les acides organiques ont une influence défavorable), par l'anaérobiose, par la vitalité très restreinte, par l'existence d'une forme invisible et stable dans le son, mais elles s'en distinguent fondamentalement par leurs produits de fermentation, qui ne sont pas l'alcool et l'acide carbonique, mais les acides acétique et butyrique. C'est la *Sarcina marina*, déjà vue mais non pas étudiée par P. Lindner, à Berlin, en 1888.

Ci-dessous on trouve l'ensemble des produits des deux sarcines, *S. ventriculi* et *S. maxima*,

**Produits du métabolisme  
de *Sarcina ventriculi* et de *Sarcina maxima***

PRODUITS (pourcentage du sucre fermenté)	<i>S. ventriculi</i>		<i>S. maxima</i>	
	Eau de levure 2 %/ de dextrose	Eau de levure 2 %/ de lévulose	Eau de levure 2 %/ de dextrose	Eau de levure 1,5 %/ de lévulose + carbonate de calcium
Acide carbonique . . . .	41,7	45,2	36,3	38,7
Hydrogène . . . .	0,58	0,7	2,55	2,36
Alcool éthylique . . . .	40,3	50,6	Trace.	Trace.
Acide formique . . . .	1,08		1,05	0,72
Acide acétique . . . .	9,0	3,7	10,0	17,3
Acide butyrique . . . .			37,4	25,4
Acide succinique . . . .			3,44	1,95
Acide lactique . . . .	3,05		10,7	7,7
Acétyl-méthyl-carbinol . . . .	Trace.	0,06		
Total. . . .	95,71	100,26	101,14	94,13

La troisième espèce de sarcines fermentatives est la *Sarcina methanica*, causant la fermentation méthanique, déjà mentionnée plus haut. Elle n'utilise pas les sucres mais seulement les sels des acides gras et certains alcools, produisant du méthane et de l'acide carbonique.

En terminant, je voudrais souligner de nouveau la grande importance des fermentations anaérobies dans la nature, qui aident au plus haut degré à établir et à conserver l'équilibre dans la nature vivante.

# ANAÉROBIES RÉDUCTEURS DES SULFATES ET FORMATION DES PÉTROLES

par A. R. PRÉVOT.

(Institut Pasteur de Paris. Service des Anaérobies.)

## I. — HISTORIQUE.

Il semblerait à première vue que la réduction des sulfates par les bactéries soit sans aucun rapport avec la formation des pétroles. Les constatations faites dans ce domaine depuis vingt ans et l'expérimentation plus récente de quelques chercheurs ont montré qu'au contraire ces deux problèmes sont intimement liés.

Nous rappellerons d'abord très brièvement la chronologie des travaux qui ont été publiés sur cette double question, puis nous donnerons une description succincte des espèces anaérobies réductrices des sulfates en montrant par quel mécanisme biochimique elles peuvent contribuer à la formation des pétroles ; enfin nous décrirons notre expérimentation personnelle, qui a étendu à d'autres espèces que celles du groupe des Sporovibrions la double possibilité de réduire les sulfates et de dédoubler les lipides.

C'est en 1895 que Beijerinck [1] décrivit la première espèce réductrice des sulfates qu'il appela *Spirillum desulfuricans* : anaérobie tellurique et aquicole, spiralé, pullulant dans les canaux des Pays-Bas, dont la propriété biochimique remarquable est de réduire les sulfates jusqu'au stade  $\text{SH}_2$  en utilisant  $\text{H}_2$  venant de donneurs spécifiques ; secondairement,  $\text{SH}_2$  attaque les composés ferriques du sol ou des milieux pour produire du sulfure de fer. Ces bactéries sont des autotrophes — chimiotrophes cultivables sur milieu minéral synthétique additionné de lactate et de sel de Mohr : les colonies du microbe sont noires, ce qui permet son isolement, d'ailleurs difficile et imparfait.

Depuis cette mémorable découverte, de très nombreux travaux sont venus étendre la connaissance morphologique, physiologique et biochimique de ce groupe. Migula [2] en 1900 reporte l'espèce au genre *Microspira*. Van Delden [3] en 1904 l'isole en culture pure et le cultive en série illimitée ; de l'eau salée des estuaires il isole une autre espèce : *Microspira aestuarii*, qui exige 3 p. 100 de  $\text{NaCl}$  dans les milieux. Ces microbes sont successivement trouvés par Gosling [4] en 1904 dans les eaux minérales natu-

relles ; par Rank [5] en 1907 dans les sables et les boues marines ; par Von Wolzogen Kühr [6] en 1922 dans les dunes hollandaises ; par Issatchenko [7] en 1924 dans les eaux de la Mer noire.

En 1925, Elion [8] décrit une nouvelle espèce thermophile sous le nom de *V. thermodesulfuricans*, que Smith et Thompson retrouvent aux Etats-Unis en 1928 [9]. La première observation reliant la réduction des sulfates à la formation des pétroles est de 1928 : Gahl et Anderson [10] reconnaissent la pullulation de ces germes dans les puits de pétrole de Californie, mais n'y voient qu'une coïncidence et non une relation de cause à effet. L'année suivante, Standnikow [11] fait agir des anaérobies lipolytiques sur des algues et autres micro-organismes riches en graisse et constate la formation de composés insaponifiables et, parmi eux, des hydrocarbures du type pétrole.

C'est à la suite de ces travaux que les géologues reconnaissent à ces microbes une action biochimique importante, d'une portée géologique considérable puisqu'elle peut expliquer la formation des gisements de sulfure, en particulier de sulfure de zinc du Missouri. Cette observation a été confirmée en 1930 par Bastin et Greer [12]. Toutefois, Thayer (1931) [13], faisant agir de la boue marine sur des diatomées et sur divers acides gras, n'a vu se former qu'un seul hydrocarbure :  $\text{CH}_4$ .

Mais aucun des grands problèmes posés par ces vibrions n'est encore résolu à cette date. Le premier va l'être en 1931 par Baars [14] qui, grâce à une expérimentation impeccable, démontre : 1<sup>o</sup> que *M. aestuarii* n'est qu'une forme d'adaptation de *Sp. desulfuricans* à l'eau salée ; 2<sup>o</sup> que *V. thermodesulfuricans* n'est qu'une forme d'adaptation de *Sp. desulfuricans* aux températures élevées ; 3<sup>o</sup> que les vibrions réducteurs de sulfates sont néanmoins multiples et que leur pluralité est d'ordre nutritionnel : le 2<sup>e</sup> terme étant *V. rubentschicki* et sa variété *anomalus*.

Entre temps, Tausson et Alioschina (1932) [15] ont pensé qu'à côté de leur aptitude à produire et à transformer les hydrocarbures des pétroles, les réducteurs de sulfate peuvent libérer les huiles adsorbées sur les schistes, les sables et les calcaires par production de  $\text{CO}_2$ , diminution de la viscosité de l'huile et dissolution des dolomites.

Dès 1937, Porfiriew [16] considérait comme démontrée la formation bactérienne des pétroles à partir des matières organiques en milieu réducteur. Strum et Orlova [17], la même année, faisant agir des bactéries sur les graisses et l'acide palmitique constatent la formation d'un liquide huileux ressemblant à la « balkhashite », saprocolle bitumeux qui se forme actuellement dans une lagune rattachée au lac Balkash.

Le deuxième problème, tout aussi capital, sera résolu en 1938 par Starkey [18] qui a démontré de façon irréfutable que toutes

ces espèces sont sporulées et a proposé de les réunir dans le genre *Sporovibrio*, espèce-type *Sporovibrio desulfuricans* (Beij.) nov. comb.

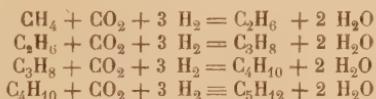
Ce genre a été adopté par nous-même en 1940 [19] de préférence au terme *Desulfovibrio* Kluyver et Van Niel [20] dont Breed, Murray et Hitchens [21] font constater l'extrême pauvreté de construction. Comme, de par sa morphologie, il ne peut pas être rattaché aux *Clostridiales* ni aux *Plectridiales*, nous avons proposé pour lui le nouvel ordre des *Sporovibrionales* [22], famille unique : *Sporovibrionaceæ*, genre unique : *Sporovibrio* Starkey, espèce-type : *Sp. desulfuricans* Beij. avec ses variétés *estuari* et *thermodesulfuricans* ; 2<sup>e</sup> espèce : *Sp. rubentschicki* avec sa variété *anomalus*.

La troisième série de découvertes commence avec Zobell. En 1938 ce savant [23] a dénombré 1.000 à 10.000 réducteurs de sulfates par gramme de sédiment marin. Aux espèces déjà connues il en ajoute deux nouvelles qui clivent les hydrocarbures à grosse molécule en molécules plus petites : *Sporovibrio hydrocarbonoclasticus*, isolé des eaux douces et *Sporovibrio halohydrocarbonoclasticus* isolé des eaux salées. Ces deux espèces seraient donc plutôt les agents de l'évolution des pétroles. Mais le Eh très bas créé par les bactéries tend à protéger les pétroles de l'oxydation (Zobell, 1943) [24]. En 1944 Jankowski et Zobell [25] ont montré que certaines espèces du genre *Sporovibrio*, cultivées à 26° en anaérobiose sur eau de mer additionnée d'acides gras, peuvent produire en trois semaines une quantité appréciable d'huile de pétrole, éthéro-soluble, insaponifiable ; l'acide *n*-caprique en particulier a donné naissance à des hydrocarbures de la série des pétroles de C<sub>10</sub> à C<sub>25</sub>. L'expérience a pu être étendue aux acides acétique, propionique, butyrique, stéarique et lactique neutralisés par la soude à pH 7. La présence d'une couche de sable stérile au fond de la fiole d'expérience accélère la formation des hydrocarbures. La même année, avec Upham, Zobell [26] montre que *Sporovibrio estuari* peut synthétiser une vaseline (la cérésine) et d'autres hydrocarbures à partir des acides gras. Mais ces mêmes bactéries sont capables de l'action opposée : Novelli et Zobell, en 1947 [27], ont montré qu'en l'absence d'autre substance organique utilisable, certaines espèces de Sporovibrions peuvent assimiler les hydrocarbures aliphatiques à poids moléculaire élevé : le décane est faiblement attaqué, le tétradécane l'est beaucoup plus ; les hauts polymères tels que eicosane, docosane, hentriocane, huile et vaseline de paraffine sont utilisés encore plus rapidement, à condition de les adsorber préalablement sur sable pour augmenter leur surface libre : une partie est oxydée ; une autre sert aux synthèses des éléments cellulaires ; le reste est converti en hydrocarbures à poids moléculaire plus petit.

En 1945, Zobell [28] a réalisé une très belle expérience qui prouve la synthèse bactérienne des paraffines de  $C_{20}H_{42}$  à  $C_{25}H_{52}$  ainsi que de la cérésine (vaseline de pétrole), à partir d'acide caprique comme seule source de carbone.

Par ailleurs, les bactéries réductrices des sulfates peuvent synthétiser de petites quantités de pétrole à partir des acides acétique, propionique, butyrique, caproïque, stéarique et lactique. En dehors de ces actions de synthèse, les bactéries peuvent jouer un grand rôle dans la libération des huiles de pétrole de leur rochemère (par attaque des carbonates ou action de surface) et secondairement leur migration puis leur accumulation dans les poches. Une autre expérience du même auteur a montré que les bactéries isolées des gisements de pétrole peuvent attaquer les huiles brutes de pétrole et les réduire à l'état d'hydrocarbures plus simples.

Au cours de ses travaux de 1946 à 1948, Zobell [29] a en outre établi : 1° la possibilité d'une conjonction entre les actions enzymatiques bactériennes (hydrogénelyase et hydrogénase) et la radio-activité, en particulier le rayonnement  $\alpha$ , ainsi que d'autres actions catalytiques dans la formation des pétroles. Il envisage ainsi la possibilité de synthèses du type :



2° La réalité de l'attaque des hydrocarbures à longue chaîne par les réducteurs de sulfates, d'où une évolution bactérienne des pétroles.

3° La libération des huiles de pétroles à partir des roches encaissantes (sable pétrolifère, schistes bitumeux, calcaires), par l'action des bactéries réductrices des sulfates et décarboxylantes (action du  $CO_2$  sur la viscosité des pétroles) et consécutivement leur migration à travers les pores et canaux des roches perméables et leur accumulation dans les poches, sous la pression des gaz qui les accompagnent.

Mais Zobell et ses collaborateurs ne sont pas les seuls à être entrés dans la voie de l'expérimentation pour la production des pétroles au laboratoire : en 1941, Clarke [30] et Mazur ont traité des diatomées par les microbes des sédiments et ont constaté une diminution de leur teneur en acides gras avec une augmentation correspondante des hydrocarbures ; parmi ceux-ci l'hen-triacontane  $C_{31}H_{64}$  prédominait.

La quatrième grande découverte a été faite récemment (1945-1946) par Rosenfeld [31], qui a montré : 1° que les anaérobies lipolytiques cultivés sur algues provoquaient une augmentation

marquée de la teneur en substance soluble dans l'éther et insaponifiable, semblable aux pétroles bruts. Cette augmentation très lente (cent trois jours) est de 0,9 à 0,13 p. 100. Elle est due à la réduction des lipides des algues en hydrocarbures ; 2° que les réducteurs de sulfates sont des lipolytiques puissants, ce qui a amené à penser que loin d'être les simples témoins de la formation des pétroles, ils ont pu en être les agents actifs. En effet, ces anaérobies peuvent hydrolyser les esters des alcools primaires, les glycérides des acides gras solubles et insolubles, ainsi que des graisses et des huiles plus complexes. L'utilisation des peptones n'exerce que rarement une action d'épargne sur l'utilisation des lipides.

En 1947 [32], par la technique des microbes non proliférants et le tube de Thunberg, il a démontré que les réducteurs de sulfate catalysent l'oxydation anaérobique d'un grand nombre de carbures d'hydrogène, parmi lesquels les hydrocarbures aliphatiques à longue chaîne sont particulièrement vulnérables ; le stade acide gras est transitoire, et est soumis à une dégradation ultérieure. L'utilisation d'hexadécane est très intense. L'ensemble de ces réactions est l'œuvre des déshydrogénases. Enfin, en 1948 [33], il a reconnu que deux groupes microbiens principaux participaient à ces réactions : les *Sporovibrio* réducteurs de sulfates, lipolytiques et les anaérobies facultatifs lipolytiques qui ne réduisent pas les sulfates ; parmi les facteurs importants affectant la déshydrogénération, on peut noter la toxicité et la solubilité du substratum ; l'effet réducteur marqué de l'acide formique activé par les bactéries est suffisant pour provoquer l'hydrogénéation énergique de l'acide linoléique.

Les bactéries lipolytiques sont abondantes dans la mer ; elles provoquent la réduction et la décarboxylation des acides gras suivant la formule  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)\text{CH}_2\text{COOH} = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3 + \text{CO}_2$ , d'où naissent des hydrocarbures. Rosenfeld les a trouvées dans les sables bitumeux, les asphalte, la paraffine.

A partir de 1940, la notion que le groupe des sporovibrions n'est pas le seul qui soit capable de réduire les sulfates s'étend : Czurda [34] trouve un spirille présentant cette propriété et différent de *Sp. desulfuricans*. Mais cette espèce est insuffisamment décrite.

La même année, le côté néfaste de leur activité biochimique est dévoilé par Berkalo et Cabasso [35] qui ont isolé *Sp. rubentschicki* dans l'eau d'un puits artésien, près de Tunis : cette espèce polyphage, en dehors des sources d' $\text{H}_2$  bien connues, peut utiliser l' $\text{H}_2$  dégagé par électrolyse dans un milieu dépourvu de sels organiques. Elle possède de ce fait un pouvoir dépolarisant marqué. Il s'ensuit une corrosion électrolytique des métaux à laquelle on peut attribuer la dégradation des tubes, tuyaux et

pompes, ainsi que les dépôts de sulfure de fer observés dans les puits artésiens. On peut empêcher cette action corrosive en recouvrant les surfaces métalliques d'une couche de sable. Toujours dans le domaine physico-chimique, Starkey et Wight, en 1943 [36], ont mesuré l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction provoqué dans les milieux au lactate par le développement de *Sp. desulfuricans* : de 400 mV il passe à — 150 et même — 250 mV.

La relation entre réduction des sulfates et corrosion du fer évoquée plus haut a été bien étudiée par Starkey en 1947 [37]. Il a vu que la réduction est progressive et exige 8 atomes d'hydrogène suivant l'équation  $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_3 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO} \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ . A chaque étape de la réduction peut se former le sel de fer correspondant d'où l'attaque du fer métallique quand il est présent et finalement la formation de sulfure de fer noir.

Dans son travail de 1946 [58] O. Richard a démontré l'existence de *Sp. desulfuricans* et de *Sp. rubentschickii* à l'exclusion de toute autre espèce sulfato-réductrice dans les boues des eaux stagnantes et courantes de Suisse. Il les a également isolées dans les sources sulfureuses de ce pays. L'acide ascorbique et la cystéine accélèrent la croissance de ces germes qu'il considère comme auxo-autotrophes.

L'intérêt capital des expériences de Laigret (1945-1947) [38] si toutefois elles sont confirmées par d'autres expérimentateurs, est d'avoir montré que des anaérobies lipolytiques autres que les Sporovibrions sont également capables de produire des hydrocarbures. Dans sa première expérience, il a tout d'abord montré que *W. perfringens*, cultivé en houillon additionné d'un formiate alcalin (sodium, calcium, baryum ou ammonium) et de 1 p. 5.000 d'iode sous forme de Lugol, n'acidifie pas le milieu et donne une fermentation méthanique ; le taux de méthane peut atteindre 80 p. 100 du volume total des gaz produits. Dans sa seconde expérience [39] il remplace les formiates par un savon alcalin (oléate) ; le milieu reste neutre, il ne se dégage plus de  $\text{CH}_4$ , mais du  $\text{CO}_2$  et il y a production d'un liquide noir non miscible à l'eau venant flotter à la surface. Ce liquide combustible renferme 15 p. 100 d'une fraction distillant entre 163 et 300°, 50 p. 100 d'une autre passant entre 300° et 350°, et un résidu non distillable constitué par un brai noir, atteignant le taux de 35 p. 100. Il a pu produire le pétrole brut « en continu », c'est-à-dire en mettant en œuvre 4 g. de savon par jour dans le flacon de fermentation et en retirant 3  $\text{cm}^3$  de pétrole brut par jour.

Bien que ne concernant pas directement ce rapport, strictement limité aux anaérobies, nous mentionnons pour mémoire, dans le but de montrer que les aérobies peuvent avoir une action parallèle, les travaux de B. Imelik [40] qui ont montré que les

microbes du sol peuvent altérer les pétroles et en particulier *Pseudomonas aeruginosa* [41], qui peut croître sur pétrole brut.

L'universalité des réducteurs de sulfate et l'insuffisance du cadre taxonomique actuel n'ont pas échappé à Hamada Minoru [42] qui, en 1947, a isolé *Sp. thermodesulfuricans* de la boue du réservoir marécageux à odeur sulfhydrique prononcée d'une source d'eau chaude sulfatée-carbonatée de Chine. Mais 70 autres souches de réducteurs de sulfate isolées de Chine centrale, de Java, des mers japonaises, n'étaient pas des *Sporotibrio* connus et prouvaient que la classification actuelle de ces germes est insuffisante.

A partir de 1947, Butlin et ses collaborateurs ont réalisé de très belles recherches sur la physiologie de ces bactéries. Butlin et Adams [43] ont d'abord établi qu'elles étaient des autotrophes facultatifs, confirmant en cela, en les étendant, les conclusions antérieures de Starkey et Wight [44] et celles de Stephenson et Stickland [45]. On sait que ces derniers auteurs rendaient responsables de la réduction de  $\text{SO}_4$  par  $\text{H}_2$ , un système enzymatique supporté par les bactéries même non proliférantes.

Bunker et Butlin, en 1947 [46], constatent que l'addition de sulfite aux milieux d'enrichissement facilite l'obtention des cultures pures pour lesquelles de petites quantités de fer sont indispensables. La micrographie électronique révèle des détails invisibles au microscope ordinaire : cil polaire unique pour les formes mobiles, taille plus grande des souches thermophiles qui ont des cils périrhéniques ; apparition de formes très longues sous l'influence du sulfate de sodium.

En 1949, Butlin, Adams et Thomas [47] ont étudié la corrosion intérieure des tuyaux de fer et ont reconnu les mêmes causes que pour la corrosion extérieure : attaque du fer par  $\text{SH}_2$  venant de la réduction des sulfates des *Sporotibrio*. Les mêmes auteurs, la même année [48], ont bien étudié les variations morphologiques de ces bactéries : polymorphisme des formes mésophiles (coccoïdes et bâtonnets courts, vibrions, spirilles) ; prédominance des formes en vibrion dans les milieux sulfate + lactate + extrait de levure ; apparition des formes spirillaires dans les milieux sulfate + lactate +  $\text{SO}_3\text{Na}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

Tels sont les principaux travaux publiés sur les bactéries réductrices des sulfates et sur la formation bactérienne des pétroles. On voit déjà par ce bref historique les relations étroites entre les deux questions et surtout leur importance, qui n'a échappé à aucun des chercheurs s'étant occupé de ces problèmes : qu'on se rappelle les deux citations de Starkey à ce sujet ; la première, qui figure en tête de son fameux mémoire de 1938, est de Beijerinck : « Les deux phénomènes de réduction les plus importants, continuellement en train dans notre entourage, dans ce qu'on appelle la minéralisation des substances organ-

niques, sont la réduction des nitrates et celle des sulfates ». La deuxième, qui figure en tête de son mémoire de 1947, est de von Wolzogen Kühr : « La réduction des sulfates est l'un des processus microbiens les plus fréquents sur la terre. »

Or, la formation des pétroles ne l'est pas moins. C'est l'un des processus les plus importants de la transformation de la matière organique au cours des âges géologiques. Nous avons surtout envisagé dans cet exposé la part des anaérobies stricts dans ce processus, mais il est certain que les aérobies y jouent leur rôle : la revue générale récente de Schwartz et Müller [57] renseignera à ce sujet le lecteur qui voudrait connaître ce côté du problème.

## II. — DESCRIPTION DES SPOROVIBRIONS RÉDUCTEURS DES SULFATES.

### 1. *Sporovibrio desulfuricans* (Beijerinck), Starkey.

*Synonymes.* — *Spirillum desulfuricans* (Beijerinck, 1895) ; *Microspira desulfuricans* (B.), Migula, 1900 ; *Vibrio desulfuricans* (B.), Baars, 1931 ; *Desulfovibrio desulfuricans* (B.), Kluyver et Van Niel.

*Habitat.* — Sol et eaux douces de Hollande. Limons ; sables. Mer Noire. Puits de pétrole de Californie. Eaux minérales naturelles. Très fréquent.

*Morphologie.* — Vibrion de 3 à 4  $\mu$  sur 0,5 à 1  $\mu$ . Très mobile. Granule noir à l'un des pôles. Spore ovale très réfringente. Cils polaires ou péritriches plus longs que le corps microbien. Polymorphisme accentué suivant les milieux et les conditions de culture. Gram-négatif.

*Physiologie.* — Anaérobie strict. Température optimum 30°-45°. Thermo-résistance : dix minutes à 60° et cinq minutes à 98°-100°. Longévité très marquée (plusieurs années).

Autotrophe-chimiotrophe. Réducteur très puissant.

Pousse sur milieu minéral au sulfate additionné de lactate.

*Cultures.* — Gazogènes.

*Isollement.* — 1° Enrichissement sur gélose-gélatine + lactate de Na + asparagine +  $\text{SO}_4\text{Mg}$  +  $\text{PO}_4\text{K}_2\text{H}$  + sel de Mohr : formation de colonies noires punctiformes qui, repiquées, donnent des cultures de plus en plus pures.

*Gélose + sulfate + sel de Mohr.* — Colonies ouatées noires.

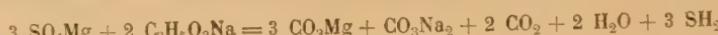
*Gaz.*

*Gélatine + sulfate + fer.* — Colonies noires punctiformes entourées d'un halo. Formation de  $\text{SH}_2$ , SFe et dépôt de S intrabacillaire.

*Donateurs d'hydrogène.* — Lactate de Na, malate de K, sels acycliques à chaîne ramifiée et d'autres corps à l'exclusion des

alcools secondaires et tertiaires et des acides acycliques à chaîne droite. Ne déshydrogène pas complètement les milieux.

Peuvent également servir : les alcools primaires, sauf méthanol ; les polyols ; certains glucides, les oxyacides  $\alpha$  : la formule de réduction est pour le lactate :

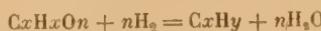


ou le rapport

$$\frac{\text{CO}_2}{\text{SH}_2} = \frac{2}{3}$$

La limitation des sources d'hydrogène aux corps précipités constitue la spécificité biochimique de *Sp. desulfuricans* et l'oppose aux variétés polyphages.

*Lipides.* Réduits en hydrocarbures suivant l'équation probable très générale :



*Pouvoir pathogène.* — Nul.

1 bis. *Sporovibrio desulfuricans* var. *aestuari* (Van Delden) Baars.

*Synonyme.* — *Microspora aestuari* Van Delden, 1904.

*Habitat.* — Estuaires des Pays-Bas. Puits de pétrole Etats-Unis. Puits artésiens Tunisie. Fréquent.

*Morphologie.* — Semblable à l'espèce-type, mais en milieu hypotonique, apparition de formes renflées immobiles.

*Physiologie.* — C'est la variété halophile, exigeant 3 p. 100 de NaCl.

Mais Gahl et Anderson ont isolé des souches intermédiaires qu'ils ont classées en trois types :

I. — Poussant avec moins de 1 p. 100 de NaCl.

II. — Poussant jusqu'à 3 p. 100.

III. — Poussant indifféremment jusqu'à 5 p. 100.

Ce type III montre qu'il n'y a pas de barrière entre les types I et II. Plus tard, Baars a montré qu'on pouvait adapter I à des salures de plus en plus élevées à condition d'utiliser des cultures très jeunes et désadapter les souches halophiles pour les ramener à des salures de moins en moins élevées. Donc, *Sporov. aestuari* est une variété adaptative de *Sporov. desulfuricans*.

*Isollement.* — Comme pour l'espèce-type sur milieux de Van Delden.

*Cultures.* — Semblables à celles de l'espèce-type.

1 *ter.* *Sporovibrio desulfuricans* var. *thermodesulfuricans* (Elion) Baars.

*Synonyme.* — *Vibrio thermodesulfuricans* Elion 1925.

*Habitat.* — Eaux douces de Hollande (Delft). Puits de pétrole de Californie où la température est de 44-47°.

*Morphologie.* — Semblable aux précédents, mais moins mobile et ne donnant jamais de formes spirillaires.

*Physiologie.* — C'est la variété thermophile, dont l'optimum de température est 55°. A cet optimum, la réduction des sulfates est maximum. Thermo-résistance : quelques minutes à 80°. La désadaptation aux températures élevées a été réalisée par Baars avec des cultures très jeunes. La réadaptation est possible.

*Isolation.* — Facilité par la thermophilie qui élimine les bactéries d'accompagnement en employant les mêmes milieux.

2. *Sporovibrio rubentschicki* (Baars) Starkey.

*Synonyme.* — *Vibrio rubentschicki* Baars 1931.

*Habitat.* — Le même que pour les précédents et Tunisie.

*Morphologie.* — Vibrion court, mobile, parfois spiralé, semblable aux précédents. Gram-négatif.

*Physiologie.* — Semblable aux précédents, avec un métabolisme différent : il utilise les acides acycliques à chaîne droite, depuis les terines inférieurs : acétique, propionique, butyrique, jusqu'aux termes supérieurs : stéarique et palmitique. Ce sont donc des polyphages ; ils attaquent en outre les glucides (succharose, lactose, maltose, galactose), les acides à chaîne ramifiée (tartrique, malique). Cette autonomie spécifique est vraie : les souches de l'espèce précédente ne s'adaptent pas à la polyphagie, le lactate leur est indispensable et ne peut pas être remplacé par le butyrate car l'enzyme attaquant l'acide en C<sub>4</sub> n'existe pas et n'apparaît jamais. Cette espèce possède en outre un caractère important : elle déshydrogène complètement les milieux.

*Pouvoir pathogène.* — Nul.

2 bis. *Sporovibrio rubentschicki* var. *anomalus* (Baars) Starkey.

*Synonyme.* — *V. rubentschicki* var. *anomalus*, Baars 1931.

*Habitat, Morphologie, Physiologie,* semblables à l'espèce-type.

*Biochimie.* — Alors que l'espèce-type utilise les acétates, cette variété est incapable de les utiliser et toute tentative pour les lui faire utiliser échoue.

## Appendice : Sporovibron d'Issatchenko.

Issatchenko, en 1924, a isolé de la vase de la mer Noire, à 2.118 m. de profondeur, un *Sporovibrio* semblable à la variété *aestuari*, donnant une quantité énorme de  $\text{SH}_2$ , mais il n'a pas été suffisamment décrit pour être identifié sûrement à cette variété.

### III. — RÉDUCTEURS DE SULFATE AUTRES QUE LES SPOROVIBRIONS. (EXPÉRIENCES PERSONNELLES.)

Dans l'historique de ce rapport, on a pu lire que plusieurs auteurs avaient pensé que la réduction des sulfates n'était pas l'apanage exclusif des sporovibrions, mais aucun n'avait pu prouver l'existence d'autres espèces réductrices.

Nous avons essayé d'aborder ce problème, tout d'abord par la méthode pondérale. Mais les difficultés de dosage des sulfates en milieu organique complexe nous ont obligé à renoncer à cette méthode : en effet, les quantités détruites sont de l'ordre des erreurs expérimentales. Ainsi avons-nous cherché une méthode qualitative [49]. Celle-ci nous a été fournie par une technique analogue à celle de Wilson, Blair et Maud [50], qui permet de détecter très facilement et très rapidement les anaérobies réducteurs de sulfite. Nous employons pour cela la gélose profonde VF glucosée à 2 p. 1.000, additionnée de 2 cm<sup>3</sup> de la solution de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$  à 20 p. 100 et d'I goutte d'une solution d'alun de fer à 5 p. 100. Nous ensemencons à chaud la gélose ainsi préparée et préalablement désaérée par ébullition en n'y introduisant que quelques unités microbiennes. Après recoagulation dans l'eau froide, on met à l'étuve à 37°. Si le microbe réduit les sulfates, les colonies sont noires. Mais ce phénomène est extrêmement rare avec les souches de collection. Alors que sur 102 souches appartenant à 31 espèces de Clostridiales nous avons pu mettre en évidence la réduction des sulfites soixante-treize fois (soit 70 p. 100 des espèces étudiées), avec les mêmes souches nous n'avons observé la réduction des sulfates que quatre fois : or, les 4 souches réductrices venaient d'être isolées des eaux et des boues. Elles appartaient aux espèces *Cl. flabelliferum* et *Cl. caproicum*. Cette propriété sulfato-réductrice s'est montrée temporaire. Au fur et à mesure des repiquages, nous l'avons vu s'atténuer rapidement, le nombre des colonies noires diminuant très vite au profit des colonies blanches, pour, finalement, disparaître de façon irréversible.

Il nous a semblé que ce fait pouvait rentrer dans le cadre des « pertes de fonction », ou plus exactement « pertes d'enzyme ».

En effet, les deux espèces réductrices sont toutes deux très gazo-gènes et produisent  $\text{SH}_2$  en abondance à partir des protides, grâce à une désulfhydrilase. Quand on les ensemence en gélose profonde VF glucosée simplement additionnée d'alun de fer, les colonies sont blanches, et il y a dépôt à distance de  $\text{FeS}$ , principalement dans les cassures de la gélose produites par le dégagement de  $\text{H}_2$ ; ceci est dû à ce que les désulfhydrilases sont des enzymes exobactériens qui diffusent dans le milieu. Au contraire, en présence de  $\text{SO}_4\text{Na}_2$ , accepteur d'hydrogène, un autre mécanisme a lieu : aucun dégagement gazeux ne se produit dans le milieu et c'est au contact du corps microbien que la réduction se fait et que l' $\text{SH}_2$  produit donne  $\text{FeS}$ . C'est donc le fait d'un enzyme endobactérien, ne diffusant pas, que nous pouvons nommer « sulfatase », comme nous avons nommé « sulfitase » l'enzyme endobactérien qui réduit les sulfites en fixant la totalité de l'hydrogène formé sur les sulfites, et qui ne diffuse pas non plus.

Les anaérobies réducteurs de sulfate décelés de cette façon, qui sont avant tout des allométatrophes, perdent leur unique fonction chimiotrophe par culture sur milieu organique complexe. C'est un comportement préférentiel dont on peut trouver de multiples exemples dans la physiologie nutritionnelle des bactéries : préférence pour tous les modes de nutrition faciles et perte des enzymes devenus inutiles.

Cette perte d'enzyme est, à notre avis, irréversible. Seules les souches fraîchement isolées de la terre et des eaux sont réductrices. Si on remet sur terre stérile les souches devenues non réductrices, il n'y a pas récupération de l'enzyme perdu.

Par la suite, nous avons recherché de nouvelles souches réductrices dans divers habitats :

1<sup>o</sup> *Gléines* [54]. Nous avons donné ce nom générique (1) aux colonies flottantes mixtes d'algues et de bactéries qui doivent leur apparition dans les sources sulfureuses à la conjonction de la réduction bactérienne des sulfates et de la croissance de bactéries phytogliéiques.

Nous avons surtout étudié les gléines de Cauterets, de Barège, de Dax et d'Uriage.

(1) De concert avec notre collègue et ami le professeur Giraud, doyen de la Faculté de Médecine de Montpellier, afin d'éviter le mot désagréable de glairines, refusé par le monde médical. Les gléines sont multiples. Suivant les lieux géographiques où elles apparaissent on les appelle : Baréginas, Daxines, Luchonines, Saint-Salvérines, Nérisines, Pyrénéines, etc. Le mot gléines est formé du grec « gloios » (glaireux, gluant).

## I. Cauterets, sources de la Raillièvre et du Pré.

En dehors de bactéries anaérobies banales telles que *Plectridium hemolysans*, *Clostridium bifermentans* n'attaquant pas les sulfates, nous y avons isolé par la gélose au sulfate + alum de fer, 4 souches répondant à une espèce nouvelle qui, pendant les premières générations sur milieu organique, donne des colonies noires. Nous lui avons donné le nom de

*Clostridium cauteretensis* nov. sp.

*Habitat.* — Gléines de Cauterets, sources Raillièvre et Pré.

*Morphologie.* — Entièrement semblable à *Cl. bifermentans*, long de 3 à 4  $\mu$  sur 0,8  $\mu$  à 1  $\mu$ . Richement sporulé avec spores clostridiennes libres en abondance. Mobilité variable suivant les souches, tantôt vive, tantôt faible. Cils périrhiziques. Gram-positif.

*Physiologie.* — Anaérobie strict. Thermo-résistance de six à quinze minutes à 100° suivant les souches. Réducteur (rouge neutre et safranine réduits).

*Cultures.* — Gazogènes et fétides.

*Gélose profonde VF.* — Colonies ouatées de taille moyenne ; gaz.

*Gélose profonde sulfate + alum de fer.* — Colonies noires pendant les quelques jours qui suivent l'isolement ; pas de gaz.

*Eau peptonée.* — Trouble abondant se déposant en dépôt visqueux (géline).

*Bouillon VF glucosé.* — Trouble très abondant. Gaz. Odeur très fétide. Dépôt visqueux, glaireux abondant.

*Gélatine.* — Liquéfiée en un à deux jours suivant les souches.

*Lait.* — Digéré en un à deux jours sans coagulation préalable. Les lipides y sont dédoublés.

*Sérum coagulé.* — Digéré partiellement par certaines souches et complètement par d'autres.

*Autres protéines coagulées.* — Partiellement digérées.

*Glucides.* — Glucose, lévulose, maltose, amidon, glycérine fermentés.

*Caractères biochimiques.* — Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites. Les sulfates sont réduits en  $\text{SH}_2$  temporairement. La fermentation du bouillon glucosé produit indol, traces de scatol,  $\text{SH}_2$ ,  $\text{NH}_3$  (0,02 à 0,08 p. 100), amines volatiles, aldéhydes, cétones, alcools ; acidité volatile totale : 0,020 à 0,027 p. 100 ; mélange d'acides isobutyrique et acétique et parfois formique. Pas d'acide lactique.

*Pouvoir pathogène.* — Nul. Ni toxine, ni hémolysine, ni lécithinase.

*Position dans la systématique.* — Cette espèce est très voisine à la fois de *Cl. bifermentans* dont elle ne se distingue que par la

réduction des sulfates et le type fermentaire et de *Cl. caproicum* ; dans ce dernier cas, la parenté est encore plus accusée puisque certaines souches de *Cl. caproicum* réduisent les sulfates également. Il s'agit donc d'une espèce du groupe *bifementans-caproicum* que nous étudions depuis plusieurs années. *Cl. cauteretensis* présente la triple propriété de réduire les sulfates, de produire des gléines et d'être lipolytique. Par ses deux premières propriétés il peut à lui seul expliquer les gléines de Cauterets et par son pouvoir lipolytique joint à son pouvoir sulfato-réducteur il peut être une des bactéries jouant un rôle dans la formation des pétroles. Son habitat pyrénéen, région riche en gisements de pétrole et d'hydrocarbures légers, vient s'ajouter à l'intérêt de ses propriétés biochimiques.

#### *Autres gléines étudiées.*

1<sup>o</sup> *Daxines*. — Nous avons retrouvé dans les daxines des sources Neche et Splendid des *Clostridium* très voisins de *Cl. cauteretensis* dont le pouvoir lipolytique est très intense, mais dont le pouvoir sulfato-réducteur est très faible et très fugace. Nous pensons qu'il s'agit de variétés de l'espèce décrite ci-dessus, associée avec des *Plectridium* et *Spirochæta daxensis*.

2<sup>o</sup> *Barégines*. — Nous avons retrouvé le même *Clostridium cauteretensis* associé avec *B. subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*.

3<sup>o</sup> *Uriagines*. — Dans l'eau d'un trop-plein de la source sulfureuse d'Uriage, des gléines ont été prélevées. Leur analyse a décelé surtout *Cl. cauteretensis*, associé avec des bactéries banales du sol et des eaux.

#### *Réduction du sulfate de baryum.*

Des pâtes de sulfate de baryum destinées aux usages radiologiques ont subi une réduction accidentelle en sulfure de baryum. Par la technique des géloses VF sulfatées nous avons pu isoler des réducteurs de sulfate appartenant aux deux groupes étudiés plus haut : 1<sup>o</sup> une variété éphémère de *Sporovibrio desulfuricans*, qui n'a pas pu être conservée : 2<sup>o</sup> des variétés temporairement sulfato-réductrices du groupe de *Cl. bifementans* et très voisines de *Cl. cauteretensis* décrit plus haut.

Ainsi ce n'est pas seulement les sulfates solubles alcalins et alcalinoterreux qui peuvent être réduits par ces bactéries, mais les sulfates insolubles des métaux lourds.

### IV. — FORMATION BACTÉRIENNE DES PÉTROLES.

Les huiles brutes de pétrole sont multiples dans leur composition et leur origine. Il n'y a pas de formation unique, ni même

bâtie sur un plan général, de ces substances. Elles varient : 1<sup>o</sup> suivant la *matière première* qui a servi à leur formation ; 2<sup>o</sup> suivant les *associations bactériennes* qui ont agi sur ces matières premières et, 3<sup>o</sup> suivant l'*évolution* qu'elles ont subie au cours des périodes géologiques.

Toutefois, il est permis d'affirmer que de toutes les substances-mères dont le métabolisme a abouti à la formation des huiles de pétrole ou substances analogues, ce sont les *lipides* qui tiennent la place la plus importante. Cela a été prouvé expérimentalement par l'école française de paléobotanique pour les bogheads, qui sont des bitumes durs peu évolués, et plus tard par d'autres auteurs pour la coorongite qui est un bitume élastique.

*Bogheads.* -- C'est Ch. Bertrand et B. Renault [52] qui ont montré en 1892, par la méthode des coupes minces, que les bogheads étaient formés par des algues oléogènes. Ils ont appelé *Pila bibractensis* (2) l'algue génératrice du boghead d'Autun et *Reinschia australis* celle des bogheads d'Australie. Par la suite, Zalessky [53] a pensé que les *Pila* étaient des *Botryococcus* très voisins des *B. brauni* actuels et les *Reinschia* des *Volvocaceæ*. P. Bertrand [54] ayant étudié les préparations originales de Ch. Bertrand et B. Renault a pu confirmer définitivement cette identification. Connaissant le comportement des *Botryococcus* actuels, on a pu établir la chronologie de la formation des bogheads.

*Premiers temps : Sapropèles.* — Les *Botryococcus* oléogènes forment à la surface de certains lacs d'épaisses couches de fleurs d'eau qui chaque hiver tombent au fond où elles forment d'importants dépôts huileux imputrescibles mais fermentescibles, pouvant atteindre 5 à 10 m. d'épaisseur. La fermentation de ces dépôts est certaine, puisqu'on y a constaté un abaissement du rH : ce sont donc des réductions bactériennes qui s'y produisent. Les sapropèles actuellement les mieux connus sont ceux du lac Ala-Kool (*Botryococcus brauni* var. *balkachiens*), du lac Beloë (*Chroococcus*), de l'Ahlbecker See (*Microcystis*).

*Deuxième temps : Saprocolles.* — Avec le temps, les sapropèles deviennent noirs et compacts : ce sont les saprocolles, véritables protobitumes, dont la distillation donne déjà une importante fraction d'hydrocarbures. C'est l'évolution microbienne des saprocolles, après recouvrement de ceux-ci par les sédiments ultérieurs des périodes géologiques qui a donné les bogheads.

*Coorongite.* — La coorongite est un bitume noir, élastique, qui se forme sur les rivages de la lagune de Coorong (Delta du Murray, Australie du Sud). Cette substance est formée par les fleurs d'eau qui pullulent dans la lagune : poussées par le vent

(2) De Bibracte, lieu géographique situé tout près d'Autun.

elles s'accumulent sur le rivage en couches épaisses. R. Thiessen [55] a appelé l'algue génératrice : *Elaeophyton coorangianum*, et d'après Zalessky c'est un *Botryococcus* (associé à des Desmidiées, Diatomées et Péridiniées). La coorongite est riche en huiles de la série des pétroles et en matières volatiles ; elle brûle avec une flamme éclairante et fond avant de brûler : distillée, elle donne 70 p. 100 d'huile de schiste, un peu de goudron, des gaz, et très peu de résidu sec. C'est donc un bitume actuel, se formant sous les yeux de l'observateur, et cela avec une très grande rapidité. Seuls les processus bactériens peuvent réaliser des transformations biochimiques de cette envergure avec cette rapidité.

*Torbanite.* — C'est le boghead d'Ecosse, aujourd'hui épuisé. Il était très riche en huile minérale ; l'algue constituante était *Botryococcus minor* et dans certains endroits des *Reinschia* (Volvocacées).

*N'Hangellite.* — C'est une substance bitumeuse de l'Afrique orientale portugaise qui se trouve autour du lac N'Hangell. C'est le métabolisme bactérien rapide des huiles d'algues sous la chaleur tropicale qui réalise ce saprocolle.

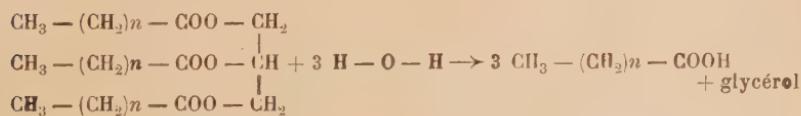
Les anciens auteurs (P. Bertrand) [56] pensaient que ces substances, bogheads, coorongite, torbanite, etc., résultait d'une simple « solidification » des gelées d'algues, composées d'huile et de gélose.

Toutefois, en 1932, dans une lettre qu'il m'adressait, P. Bertrand croyait à une intervention bactérienne, à une fermentation et prévoyait le développement de la période bactériologique des pétroles.

A la lumière des faits d'ordre bactériologique qui ont été mis à jour depuis vingt ans, nous pouvons maintenant reconstituer les étapes de la formation enzymatique des pétroles.

*Première étape : Lipolyse.* — C'est l'œuvre des lipases bactériennes et surtout celles des anaérobies lipolytiques, réducteurs ou non des sulfates.

Prenons comme exemple un triglycéride. Il se produit une hydrolyse catalytique par lipase dont le premier temps fournira un acide gras :

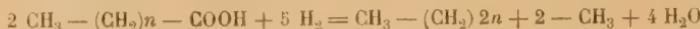


Cette action enzymatique peut conduire entre autres à l'acide caprique dont Zobell et ses collaborateurs ont montré expérimentalement qu'il peut servir à la synthèse des hydrocarbures des pétroles.

*Deuxième stade : Synthèse des hydrocarbures à partir des acides gras.* — Dans le cas de l'exemple ci-dessus et par voie de réduction, la source d'hydrogène pouvant être les galactanes des algues ou d'autres glucides des matières organiques animales ou végétales, on a le schéma :



Ici  $n$  pouvant être 12, 14 ou 16, les hydrocarbures où  $n > 16$ , se produisent par polymérisation (Hydrocarbure en  $\text{C}_{36}$ ) :



*Troisième stade : Evolution des hydrocarbures à PM élevé en hydrocarbures à PM plus faible.* — Cette action biochimique dont les expérimentateurs modernes ont montré la possibilité par voie bactérienne est une réaction complexe et probablement indirecte. Les travaux de B. Imelik [40, 41], faits avec des aérobies, en montrent quelques aspects et ceux de Zobell et collaborateurs toute l'amplitude.

*Quatrième stade : Migration.* — Après action de surface du  $\text{CO}_2$ , les huiles de pétrole deviennent moins visqueuses, se désadsorbent de leur roche-mère et, par déclivité, s'écoulent vers les failles, s'accumulant dans les poches où on les rencontre aujourd'hui.

Tel est le schéma de la formation des pétroles tel qu'on peut le reconstituer à la lumière des travaux récents.

#### CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> Le problème des anaérobies réducteurs des sulfates est intimement lié à celui de la formation des pétroles, car les lipases de ces bactéries sont capables de réaliser, dans la nature comme au laboratoire, le premier temps de la transformation des lipides végétaux et animaux en hydrocarbures du type des pétroles.

2<sup>o</sup> Les Sporovibrions anaérobies actuellement connus ne représentent pas toutes les espèces existantes de ce groupe. Il doit exister de nombreuses espèces et variétés autres que les 7 qui ont été décrites, et peut-être même d'autres genres que *Sporovibrio* Starkey.

3<sup>o</sup> Il existe des anaérobies réducteurs de sulfates autres que les Sporovibrions. Ceux-ci sont des allométatrophes et leur sulfatase disparaît vite en culture. Une espèce nouvelle : *Cl. cauteretensis* a été étudiée et décrite.

4<sup>o</sup> L'école française de paléobotanique a été à l'origine de la découverte de la formation bactérienne des pétroles en montrant en 1892 la formation par étape des Bogheads.

5° Toutes les étapes de la dégradation bactérienne des lipides et de la synthèse enzymatique des hydrocarbures sont maintenant expérimentalement démontrées et il est possible de produire au laboratoire, par culture microbienne, des substances analogues aux pétroles bruts.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEIJERINCK. *Arch. Néerl.*, 1895, **29**, 233, *C.f.B.*, II, 1895, **4**, 1, 49 et 104 ; *C.f.B.*, II, 1900, **6**, 193.
- [2] MIGULA. *Syst. d. Bakt.*, 1900, **2**, 1016.
- [3] VAN DELDEN. *C.f.B.*, II, 1904, **11**, 81.
- [4] GOSLING. *C.f.B.*, II, 1904, **13**, 385.
- [5] RANK. *Dissert. Zurich*, 1907.
- [6] VON WOLZOGEN KÜHR. *Proceed. Kon. Akad. v. W. Amst.*, 1922, **25**, 188 et *Water*, 1934, **18**, 147 ; 1938, **22**.
- [7] ISSATCHENKO. *Mem. Com. Géol.*, nouv. série, 1927, 148 ; *J. Bact.*, 1940, **40**, 379.
- [8] ELION. *C.f.B.*, II, 1924, **63**, 58 ; 1925, **63**, 58 et 1928, **74**, 442.
- [9] SMITH et THOMPSON. Cité par Weinberg, Nativelle et Prévot, 1928.
- [10] GAHL et ANDERSON. *C.f.B.*, II, 1928, **73**, 331.
- [11] STANDNIKOW. *Brennstoff. Chem.*, 1929, **10**, 477.
- [12] BASTIN et GREER. *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geol.*, 1930, **14**, 153.
- [13] THAYER. *Bull. Am. Ass. Petrol. Geol.*, 1931, **15**, 441.
- [14] BAARS. *Dissert. Delft.*, 1931.
- [15] TAUSSON et ALIOSCHINA. *Mikrobiologuia*, 1932, **1**, 229.
- [16] PORFIRIEW. 17<sup>e</sup> Sess. Intern. Geol. Congress Moscow, 1937, 7.
- [17] STRUM et ORLOVA. *Mikrobiologuia*, 1937, **6**, 754.
- [18] STARKEY. *Arch. Mikrob.*, 1938, **9**, 268.
- [19] PREVOT. *Ces Annales*, 1940, **64**, 117.
- [20] KLUYVER et VAN NIEL. *C.f.B.*, II, 1936, **94**, 369.
- [21] BREED, MURRAY et HITCHENS. *Bergey's Manual*, 6<sup>e</sup> édit., 207.
- [22] PREVOT. *Manuel de Classification des Anaérobies*, 2<sup>e</sup> édit., 1948, 223.
- [23] ZOBELL. *J. Sed. Petrol.*, 1938, **8**, 10.
- [24] ZOBELL. *Bull. Am. Ass. Petrol. Geol.*, 1943, **27**, 1175.
- [25] JANKOWSKI et ZOBELL. *J. Bact.*, 1944, **47**, 447.
- [26] ZOBELL et UPHAM. *Bull. Scripps Inst. Ocean*, 1944, **5**, 239.
- [27] NOVELLI et ZOBELL. *J. Bact.*, 1944, **47**, 447.
- [28] ZOBELL. *Science*, 1945, **102**, 364.
- [29] ZOBELL. *Bact. Rev.* 1946, **10**, 1 ; *Bull. Am. Ass. Petr. Geol.*, 1947, **31**, 1709, et *The Oil Weekly*, 1948 ; *World Oil*, 1947, 1.
- [30] CLARKE et MAZUR. *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 283.
- [31] ROSENFIELD. *Doct. Diss. Univers. Calif.*, 1945, La Jolla.
- [32] ROSENFIELD. *J. Bact.*, 1947, **54**, 664.
- [33] ROSENFIELD. *Arch. Bioch.*, 1948, **16**, 263.
- [34] CZURDA. *Arch. Mikrob.*, 1946, **11**, 187.
- [35] BERKALOF et CABASSO. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, 1940, **29**, 262.
- [36] STARKEY et WIGHT. *J. Bact.*, 1943, **45**, 39.
- [37] STARKEY. *Ant. v. Leeuw.*, 1947, **12**, 193.
- [38] LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.*, 1945, **221**, 359.

[39] LAIGRET. *C. R. Acad. Sci.* 1947, **225**, 398.

[40] IMELIK. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 922.

[41] IMELIK. *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1227 et 2082 et **227**, 1178.

[42] HAMADA MINORU. *Saiensu*, 1947, **460**, 154.

[43] BUTLIN et ADAMS. *Nature*, 1947, **160**, 154.

[44] STARKEY et WIGHT. *Rep. Am. Gas. Ass. Iron. Cor. Res. Fell.* 1915.

[45] STEPHENSON et STICKLAND. *Biochem. J.*, 1931, **25**, 215.

[46] BUNKER et BUTLIN. *C. R. 4<sup>e</sup> Congr. Intern. Microb.*, 1947, 457.

[47] BUTLIN, ADAMS et THOMAS. *Nature*, 1949, **163**, 26.

[48] BUTLIN, ADAMS et THOMAS. *J. Gen. Microb.*, 1949, **3**, 46.

[49] PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 571.

[50] WILSON, BLAIR et MAUD. *J. Path. a. Bact.*, 1924, **27**, 119.

[51] PRÉVOT. *Les Barégines. Rapp. 1<sup>er</sup> Congr. Intern. Soufre*, Caulerets, 1948.

[52] BERTRAND (Ch.) et RENAULT (B.). *Bull. Soc. Hist. Nat. Autom.* 1892, **5**, 160.

[53] ZALESSKY. *Bull. Com. Géol. Russe*, 1914, **33**, 405 et *Rev. Gén. Bot.* 1926, **38**, 31.

[54] BERTRAND (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1927, **96**, 695.

[55] THIESSEN (R.). U. S. A., *Geol. Surv.*, 1925, **132**, 1.

[56] BERTRAND (P.). *Mém. Congr. Intern. Mines*, Liège, 1930.

[57] SCHWARTZ et MÜLLER. *Erdöl u. Kohle*, 1948, 232.

[58] RICHARD (O.). *Zeitsch. Hydrol.*, 1946, **10**, 124.

## ANAÉROBIES CELLULOLYTIQUES

par J. POCHON.

(Institut Pasteur. Service de Microbie technique.)

Les problèmes posés par les anaérobies cellulolytiques sont nombreux et surtout extrêmement divers. C'est que les activités de ces microorganismes sont elles-mêmes variées en fonction du milieu où ils prolifèrent ; ce milieu est, dans tous les cas, complexe. Les anaérobies cellulolytiques y sont au sein d'une microflore nombreuse où les interactions jouent un rôle important ; c'est dire qu'il est très difficile de dissocier l'activité des cellulolytiques de celle de l'ensemble de cette microflore et qu'il s'agit le plus souvent de véritables symbioses, au sens large du mot.

Ce n'est pas en fonction de la systématique, de la morphologie, mais de leur action physiologique qu'il est intéressant de grouper les anaérobies cellulolytiques ; aussi étudierons-nous successivement dans ce rapport les germes du sol, les germes du tube digestif des animaux et de l'homme, les germes thermophiles.

Les germes du sol posent surtout des problèmes d'agrobiologie d'une importance considérable pour la vie des sols. Ceux du tube digestif, des problèmes de physiologie. Les germes thermophiles, des problèmes industriels (fermentations) ou agricoles (fumiers).

Enfin, l'ensemble des anaérobies cellulolytiques mériterait une étude approfondie du point de vue strictement bactériologique. Cette dernière partie nous permettra de prendre une vue d'ensemble de la « fonction cellulolytique ».

### I. — ANAÉROBIES CELLULOLYTIQUES DES SOLS.

Ce sont les plus anciennement connus et les premiers isolés puisque c'est Omelianski qui décrivit tout d'abord *Caduceus cellulosa* *hydrogenicus* et *Caduceus cellulosa* *methanicus* (1). Or, il est tout à fait remarquable que cette question ait été depuis

(1) Nous adoptons dans ce rapport la terminologie et la systématique de A.-R. Prévot.

presque complètement abandonnée. Une seule espèce nouvelle, à notre connaissance, a été décrite : *Plectridium spumarum* (Prévot et Pochon, 1939), isolée, en réalité, des écumes de sucrerie, mais qui présente tous les caractères, qui seront exposés plus loin, des anaérobies cellulolytiques du sol. Morphologiquement, c'est un *Plectridium*, qui n'attaque la cellulose qu'en anaérobiose avec formation d'acides acétique et butyrique, de traces d'alcool éthylique et de gaz inflammables (pas de pigments). A l'isolement, aucun sucre n'est fermenté ; après un certain nombre de repiquages un assez grand nombre de glucides sont fermentés lentement.

Si à ces trois espèces l'on ajoute un germe isolé de la boue par Hungate, mais incomplètement décrit (bâtonnet ne se colorant pas par la méthode de Gram, très polymorphe ; faisant fermenter la cellulose avec formation d'acides volatils, non identifiés, d'hydrogène et de sures réducteurs dans les vieilles cultures ; faisant fermenter un certain nombre de sures), on peut dire que là se bornent nos connaissances sur les anaérobies cellulolytiques du sol.

Cette incroyable carence est vraisemblablement en rapport avec le fait que l'attention des chercheurs a été surtout attirée par les cellulolytiques aérobies dont on admettait, un peu *a priori*, que leur action était prépondérante, sinon exclusive dans les sols de culture des climats tempérés.

Nous avons cherché à préciser le rôle relatif des aérobies et des anaérobies afin de voir si, réellement, les anaérobies étaient aussi dénués d'intérêt pratique qu'on semblait le penser.

La technique nécessaire à cette étude a été mise au point par notre collaborateur Y. T. Tehan (inspirée de celle de Winogradsky pour l'étude des fixateurs d'azote) : elle consiste à utiliser des colonnes de terre, avec feuilles de papier filtre portant des colorants de RH et permettant de faire varier séparément divers facteurs physiques et chimiques, dans des conditions aussi proches que possible de celles réalisées naturellement dans le sol.

Dans une série d'expériences nous avons étudié l'influence de la température, de l'humidité, du tassement, de la teneur en azote sur l'activité relative des aérobies et des anaérobies. Les résultats peuvent être résumés de la façon suivante :

Plus la température est élevée, plus la zone des anaérobies s'étend et approche de la surface du sol et plus l'activité de ces bactéries est intense et précoce. Au-dessus de 35°, les aérobies (bactéries et champignons) sont pratiquement inactifs, les anaérobies régnant jusqu'à 3 cm. de la surface.

Plus le taux d'humidité augmente, plus la zone des anaérobies s'étend : à saturation et sous couche d'eau, les anaérobies sont seuls actifs.

Plus le tassement augmente, plus la zone des anaérobies s'étend.

La relation entre la flore d'une zone et le rH de cette zone est fixe : dans la zone des aérobies, le rH est toujours supérieur à 14 ; dans la zone des anaérobies, il est inférieur à 5,8 et descend parfois jusqu'à 3,1.

Inutile de dire que les variations concomitantes de plusieurs facteurs peuvent agir de façon synergique ou antagoniste et cela est d'une extrême importance au point de vue des sols, dans les conditions naturelles.

Dans un sol bien travaillé, régulièrement enrichi en azote, bien aéré, sous un climat tempéré où la température oscille entre 5° et 25° suivant la saison et la profondeur (moyenne du bassin parisien), sans périodes prolongées de pluies intenses, les conditions optimales se trouvent réalisées pour les champignons et les B. aérobies jusqu'à une profondeur de 30 cm. environ, ce qui est la profondeur moyenne utile pour la plupart des cultures saisonnières. Dans ces sols, l'activité relative des champignons et des bactéries sera surtout fonction de la réaction de la terre ; les premiers seraient surtout favorisés par un pH acide (sols humiques des forêts, par exemple) ; les seconds par un pH alcalin (sols amendés à la chaux).

A l'opposé, dans les sols tropicaux où la température moyenne en surface dépasse couramment 35°, presque constamment imbibés à saturation par les pluies, ou même noyés sous une couche d'eau, comme c'est le cas des rizières, toutes les conditions se trouvent réalisées pour que travaillent uniquement les anaérobies.

Dans les cas intermédiaires, réalisés par toutes les associations possibles de facteurs, on peut imaginer une action synergique, à prédominance variable, des aérobies et des anaérobies ; il nous semble que lorsque tous les facteurs favorisant les anaérobies se trouvent associés, le seuil, pour chacun d'eux, est suffisamment bas pour que de telles conditions soient réalisées, à une profondeur relativement faible, même sous nos climats tempérés.

Il s'agit d'un équilibre biologique variable suivant les saisons et réversible. Notre méthode nous a permis de bien mettre ce fait en évidence : dans une colonne placée à 33°, tassement moyen, imbibée à saturation ; le bleu de méthylène est réduit jusqu'à 3 cm. de la surface et les anaérobies remontent jusqu'à ce niveau. En laissant suffisamment longtemps cette colonne à l'étuve, l'eau s'évapore peu à peu ; on voit le bleu de méthylène se recolorer et les aérobies se mettre à proliférer dans la zone supérieure qui était auparavant l'apanage des anaérobies.

De l'ensemble de ces résultats nous pensons pouvoir conclure que le rôle des anaérobies n'est pas négligeable, surtout dans les pays tropicaux et que leur étude, à peine ébauchée, mérite d'être poursuivie.

## II. — ANAÉROBIES CELLULOLYTIQUES DU TUBE DIGESTIF.

L'étude des anaérobies cellulolytiques du tube digestif, commencée presque en même temps que celle de ceux du sol, a, par contre, été poursuivie régulièrement et, depuis quelques années, a même suscité un nombre considérable de travaux. Elle comporte deux grands chapitres : germes du tube digestif des ruminants et des herbivores en général, de beaucoup le plus important ; germes du tube digestif de certains invertébrés.

**A. RUMINANTS ET HERBIVORES.** — On sait depuis fort longtemps (Haubner, 1855) que le bœuf est capable de digérer la cellulose, que cette digestion est le fait non d'un enzyme sécrété par l'animal, mais de sa flore bactérienne digestive (Tappeiner, 1881), que la valeur nutritive de la cellulose pour les ruminants est sensiblement égale à celle de l'amidon (Kellner et Kohler, 1900). Le problème qui se posait aux chercheurs était donc double : quels sont les microorganismes responsables de la digestion de la cellulose ? Par quel mécanisme assurent-ils l'assimilation et la nutrition ?

a) *Microorganismes responsables de la digestion.* — Dans un premier stade la fermentation fut réalisée à partir de la flore totale de la panse. Les auteurs enseignaient un milieu contenant du papier filtre avec du contenu de panse et constataient la fermentation, la disparition de cette source de cellulose (Tappeiner, 1882 ; Ankersmit, 1905 ; Choukevitch, 1911 ; Ellenberger, 1915 ; Hopfse, 1919). Mais en cherchant à faire des repiquages en série, tous ces auteurs s'aperçurent que le pouvoir cellulolytique des cultures baissait peu à peu pour disparaître complètement. Ils pensèrent donc que la digestion était le fait d'une symbiose entre de nombreuses espèces, parmi lesquelles des bâtonnets sporulés jouaient un rôle prépondérant.

En 1923, avec le travail de Khouvine, commence l'ère des cultures pures : en ajoutant aux milieux de culture un filtrat stérile de matière fécale (en travaillant sur l'intestin humain) cet auteur, après un grand nombre de passages, obtint une culture pure d'un germe cellulolytique (*Caduceus cellulosae dissolvens*) anaérobio strict, ne faisant fermenter que la cellulose, ne pouvant être cultivé qu'en présence d'extrait fécal, élaborant un pigment jaune et dont la morphologie correspond au genre *Caduceus* (bâtonnet sporulé, immobile, ne se colorant pas par la méthode de Gram). Ainsi était démontré pour la première fois qu'une espèce pure pouvait être donnée d'un pouvoir cellulolytique, sans symbiose, et qu'elle pouvait être indéfiniment cultivée, à condition qu'on lui fournisse un milieu contenant les éléments nutritifs appropriés.

Très vite un assez grand nombre de germes furent isolés du tube digestif des ruminants et individualisés en autant d'espèces : Cowles et Rettger, 1931 (*Caduceus cellulosolvens*) ; Clausen, 1931 (*Clostridium naticulum*), Simola, 1931 (*Clostridium myxogenes*), V. Meyer, 1935, Pochon, 1935 (*Plectridium cellulolyticum*), Woodman et Evans, 1938, Natto, 1948, R. Meyer, 1938.

Tous ces auteurs opéraient sensiblement de la même façon, inspirée de celle mise au point par Khouvine : milieu salin contenant un filtrat de liquide de panse, ensemencé avec du contenu de panse ; cellulose fournie sous forme de papier filtre ; purification lente et laborieuse par repiquages successifs en ensemencant les milieux neufs avec des fragments de papier en fermentation (les germes se trouvant fixés sur les fibres) avec ou sans chauffage (les germes étant sporulés). Etant donné que la culture ne pouvait être obtenue sur milieux solides et que l'on ne pouvait par conséquent partir d'une colonie unique, un doute restait toujours sur la pureté des souches.

Les germes ainsi obtenus sont morphologiquement voisins : bâtonnets sporulés rentrant dans les groupes *Clostridium*, *Plectridium*, *Caduceus*.

Physiologiquement, ces germes sont assez différents les uns des autres : les uns ne fermentent que la cellulose, d'autres fermentent certains sucres, les uns sont pigmentés, les autres pas ; tous font fermenter la cellulose avec formation de gaz (hydrogène, gaz carbonique, parfois méthane) et d'acides volatils ; mais ces acides sont différents selon les espèces ; les uns donnent les acides formique et acétique, les autres les acides acétique et butyrique. Chez presque tous on peut mettre en évidence une cellulase car les sucres réducteurs (glucose, cellobiose) s'accumulent dans le milieu chez les vieilles cultures, soit spontanément, soit après addition d'un antiseptique, soit après un changement de pH.

Tous ces caractères apparaissent bien ténus pour la différenciation des espèces, hormis la morphologie et la nature des acides volatils élaborés : surtout un grand nombre de souches, présentant des caractères intermédiaires entre ceux des espèces individualisées, ont pu être isolées (Pochon, 1933). Aussi, en 1933, V. Meyer admettait-il qu'il s'agissait là d'un groupe très homogène d'espèces très voisines et d'individualisation à peine licite, tout au moins pour un grand nombre d'entre elles.

En somme, d'après ces travaux, la digestion de la cellulose apparaît comme le fait de bactéries sporulées anaérobies ne pouvant être cultivées que dans un milieu complexe contenant du filtrat du contenu digestif de l'animal hôte. On sait maintenant que ce filtrat apporte des facteurs de croissance indispensables car Hungate (1944) a pu isoler et cultiver un germe du même

type (*Clostridium cellobioparus*) sur un milieu salin additionné de biotine (germe d'ailleurs un peu particulier par la formation abondante de cellobiose, sans glucose).

La question de la nature des bactéries cellulolytiques du tube digestif paraissait donc à peu près résolue, mais des recherches plus récentes sont venues la compliquer singulièrement.

En réalité, déjà en 1919, Henneberg avait signalé qu'à l'examen microscopique direct du contenu de panse et de la cellulose en voie de digestion, on peut constater la présence, à côté des bactéries sporulées, de très nombreux cocci, fixés sur les fibres, en particulier au niveau précis des endroits attaqués. Sur cette seule observation directe il avait même décrit trois espèces : *Micrococcus ruminantium*, *Streptococcus iodophilus* et *Micrococcus pigmaeus*.

De 1931 à 1937, Baker et Martin précisèrent cette notion : ils localisèrent d'abord de façon plus précise les débuts d'attaques sur la fibre en opérant en lumière polarisée et retrouvèrent, au niveau de ces lésions, des cocci se colorant ou ne se colorant pas par la méthode de Gram, surtout caractérisés par leur iodophilie, à l'exclusion des bâtonnets sporulés ; en 1939, Baker concluait de ses recherches que les bactéries réellement actives étaient les cocci et que les bâtonnets isolés en culture par tous les autres auteurs n'étaient vraisemblablement que des germes du sol, traversant le tube digestif sans y jouer de rôle effectif.

Des observations du même ordre sont faites par Kohler en 1940 (qui garde cependant la conception classique) et par Trautman et Asher (1940).

Aussi toute une série d'auteurs ont-ils cherché à cultiver et à isoler les cocci ainsi que les formes ne correspondant pas aux bâtonnets sporulés classiques.

Travaillant sur le porc, Vartiavaara et Roine (1942) obtiennent *in vitro* des cultures où prédominent les cocci.

Mais c'est seulement en 1947 que Hungate, en modifiant complètement les techniques, parvient à isoler et à cultiver des cocci et des bâtonnets non sporulés cellulolytiques. Cet auteur travaille sur milieu solide : gélose additionnée de cellulose traitée par des vapeurs chlorhydriques, puis finement broyée. Cette gélose-cellulose est additionnée de sels et de filtrat de contenu de panse ou d'extrait de levure. Les isolements sont faits à partir de colonies uniques prélevées sur ce milieu, colonies entourées d'une zone claire correspondant à l'attaque de la cellulose par une cellulase. Quatre ou cinq souches de cocci ont été ainsi isolées.

Le diamètre moyen des éléments est d'environ 1  $\mu$ . Ils sont isolés ou groupés en courtes chaînettes ; le plus souvent Gram négatif, parfois encapsulés : les germes des colonies jeunes sont

iodophiles, parfois pigmentés (surtout en présence d'extrait de levure). Des corps réducteurs apparaissent dans les vieilles cultures. Il s'agit vraisemblablement d'espèces très voisines, mais encore insuffisamment étudiées pour que leur identification soit possible ; en particulier leur étude biochimique n'est pas encore faite.

Il en est de même pour les formes en bâtonnet isolées par le même auteur dans le même milieu : les cellules jeunes ont 0,4  $\mu$  sur 1  $\mu$ , mais s'autolysent rapidement pour donner de petits sphéroïdes ; ils ne sont pas iodophiles ; ils utilisent, en plus de la cellulose, le cellobiose et le glucose, mais la morphologie change alors (cellules beaucoup plus grosses). Sur gélose-cellulose les colonies apparaissent comme de simples plages transparentes ; au microscope les germes sont vus groupés à la périphérie de cette plage. Six souches relativement voisines ont été ainsi isolées, assez proches de celles décrites par Dougherty, en 1941. Ici encore leur étude est tout à fait insuffisante pour une identification précise.

Fort récemment (1948), Sijpesteijn, avec une technique voisine, a isolé des germes du même type pour lesquels cet auteur propose deux genres nouveaux.

Genre *Ruminobacter*, espèce type *R. parvum*. Cellules ovoïdes, isolées, immobiles, sans endospores, Gram —, hétérotrophes, non iodophiles. Leur description est encore très incomplète et leur métabolisme, en particulier, n'a été étudié que sur des souches impures : il y a formation, à partir de la cellulose, d'acides acétique, propionique et de traces d'acide butyrique.

Genre *Ruminococcus*, espèce type *R. flavefaciens*. Cellules cocciformes, en courtes chaînettes, immobiles, Gram +, hétérotrophes ; fort peu cellulolytiques en culture pure (davantage en cultures mixtes). Ici encore, l'étude est très incomplète et le métabolisme n'a été étudié que sur des cultures impures ; il y a formation d'acides formique, acétique, butyrique, lactique et surtout d'acide succinique.

Nous en aurons terminé avec cette énumération de germes anaérobies du tube digestif en signalant un germe non identifié (pseudo-levure ou infusoire) décrit par Quin en 1943 et retrouvé par Mc Gaughey et Sellers en 1948 (*Shizo-saccharomyces* ou *Selenomonas ruminantium*) qui, d'après ces auteurs, jouerait un rôle important dans la panse.

Le deuxième problème qui se posait aux bactériologistes était de déterminer, parmi cette multitude de germes, ceux qui étaient réellement actifs dans le tube digestif et responsables de la digestion.

Jusqu'en 1939, l'accord était à peu près unanime pour reconnaître ce rôle aux bactéries sporulées. La tendance actuelle, sur-

tout avec Baker, Hungate, Vartiovaara et Sijpesteijn, est au contraire de leur dénier toute activité et d'attribuer celle-ci aux cocci et bâtonnets non sporulés.

Les principaux arguments mis en avant par ces auteurs pour appuyer leur opinion sont les suivants :

L'examen microscopique direct montre surtout des cocci (Baker).

Les cultures sur gélose-cellulose aboutissent assez régulièrement à l'isolement de cocci et de bâtonnets non sporulés (Hungate).

Les cultures sur milieu additionné de petites quantités de filtrat de panse donnent bien des bactéries sporulées classiques, mais si l'on augmente la quantité de filtrat, celles-ci disparaissent et seuls cultivent les cocci, donc dans des conditions plus proches de celles de la panse (Sijpesteijn).

Le délai de cellulolyse serait plus court et donc plus proche des délais *in vivo* avec cette dernière catégorie de germes (Sijpesteijn).

Pour tous ces auteurs les bactéries sporulées seraient des germes du sol qui ne seraient que traverser le tube digestif et y seraient inactifs.

A notre avis, la question est loin d'être tranchée et aucun des arguments évoqués ci-dessus ne nous paraît entièrement convaincant :

L'examen microscopique direct est loin de montrer uniquement des cocci et la microflore apparaît fort variable en fonction de l'alimentation.

L'utilisation de la gélose-cellulose a depuis longtemps été vivement critiquée par Winogradsky et l'on sait à quelles erreurs elle avait abouti dans l'étude de germes cellulolytiques aérobies (Kellermann). Le test de la zone claire entourant une colonie est bien faible pour affirmer un pouvoir cellulolytique important, et, de fait, Sijpesteijn reconnaît que ses cultures pures sont presque entièrement dénuées de ce pouvoir.

L'argument le plus valable est celui tiré de la concentration du filtrat de liquide de panse dans le milieu de culture. Quant à la question de la rapidité de fermentation, l'examen attentif des délais donnés par Sijpesteijn ne nous semble pas la trancher de façon bien nette.

Surtout il nous paraît impossible d'admettre que les bactéries sporulées des premiers auteurs ne soient que des bactéries du sol. Celles-ci, en effet, sont facilement cultivables dans les milieux salins (formes libres à pouvoir de synthèse élevé) alors que celles isolées du tube digestif ne peuvent être cultivées qu'en présence de substances organiques complexes (filtrat de liquide digestif, extrait de levure) ou de facteurs de croissance (biotine).

Elles ont donc le caractère essentiel des germes parasites à pouvoir de synthèse faible. D'ailleurs, Sijpesteijn reconnaît avoir perdu ses souches de bactéries sporulées, au cours de passages en série, et nous savons nous-même suffisamment la fragilité de ces souches parasites pour être surpris de ce fait.

Enfin, il faut bien dire que toutes les souches récemment isolées, cocci et bâtonnets non sporulés, sont encore insuffisamment décrites et étudiées pour qu'on puisse se faire une idée nette de leur activité.

Nous pensons donc que la question n'est pas encore résolue et qu'il est fort probable que, dans ce milieu complexe qu'est la panse, un grand nombre de microorganismes peuvent agir à la fois en synergie.

b) *Rôle des microorganismes dans l'assimilation et la nutrition.* — Nous serons très bref à ce sujet car il s'agit plus d'une question de physiologie que de bactériologie.

Tous les germes anaérobies étudiés libèrent, au cours de la fermentation de la cellulose, des gaz (hydrogène, gaz carbonique, méthane), des acides volatils (formique à butyrique), des acides fixes (lactique et succinique), de petites quantités d'alcool et, inconstamment, dans les cultures âgées, des sucre réducteurs, glucose et cellobiose. Enfin, certains d'entre eux (iodophiles) élaborent dans leur cytoplasme des substances du type du glycogène.

Trois grandes théories ont été émises pour expliquer la nutrition des ruminants à partir de ces corps.

1<sup>o</sup> La plus ancienne (Woodman-Lehman-Pochon) admettait que les corps réducteurs qui se forment au cours de la fermentation devaient jouer un rôle. Le mécanisme le plus probable de leur élaboration semblait être le changement de pH survenant, à partir de la panse, lors du passage dans la caillette (acide). Cette théorie, où les infusoires avaient également leur place, est abandonnée par les auteurs modernes.

2<sup>o</sup> Une théorie plus récente (Baker) fait jouer le rôle prépondérant aux substances de type glycogène élaborées par les germes iodophiles ; substances qui seraient ultérieurement digérées et assimilées comme l'amidon, dans le tube digestif, soit après autolyse des bactéries, soit après absorption par les infusoires de la panse, soit par hydrolyse enzymatique.

3<sup>o</sup> La théorie la plus moderne, et qui semble actuellement démontrée, admet la valeur énergétique directe des acides volatils et fixes. Des calculs de thermodynamique ont montré cette valeur énergétique ; des expériences de physiologie ont mis en évidence le passage de ces acidés dans le sang, au niveau de la panse, à un pH convenable (Marston-Barkcroft, Mc Anally et Phillipson, Danielli, Hitchcock, Marshall et Phillipson, Gray, Pilgrim...).

**B. INSECTES ET LARVES XYLOPHAGES.** — Un certain nombre d'invertébrés sécrètent une cellulase ; d'autres, bien que cellulophages, n'en sécrètent pas ; parmi les premiers et les seconds on trouve des espèces qui possèdent dans leur tube digestif des bactéries cellulolytiques. Toutes celles qui ont été isolées appartiennent au grand groupe des bactéries sporulées, à une exception près.

*Terminosporus cellulosam fermentans* isolé de la larve *Potelia cuprea* (Werner), souches voisines isolées de *Rhagium cycophanta* et de *Tipula oleacea* (Pochon), *Caduceus leptinotarsae* (Sartory et Meyer) isolé du tube digestif du doryphore.

Toutes ces espèces sont très voisines les unes des autres, voisines également des bactéries du sol, type *Plectridium spumarum* et des bactéries du tube digestif des ruminants, type *Plectridium cellulolyticum*. Ou, plus précisément elles présentent, au point de vue de leurs besoins nutritifs, des caractères intermédiaires entre ces deux groupes, c'est-à-dire qu'elles peuvent être cultivées assez rapidement, au cours des repiquages, dans des milieux salins, alors qu'à leur isolement elles nécessitaient un milieu enrichi en matières organiques. C'est dire qu'elles présentent une adaptation faible à la vie parasitaire, en raison, vraisemblablement, de la différenciation minime du contenu digestif de l'animal hôte.

Il faut enfin signaler l'isolement, par Hungate, d'un Actinomycète (*Micromonospora propionici*) à partir du tube digestif des Termites.

Au point de vue physiologique il est intéressant de noter un phénomène de « convergence » morphologique et l'abondance particulière de ces bactéries dans les parties dilatées et à transit ralenti du canal digestif.

### III. — ANAÉROBIES CELLULOLYTIQUES THERMOPHILES.

Groupe assez homogène, trouvé dans le sol et surtout les fumiers, de germes anaérobies cellulolytiques dont l'optimum thermique est compris entre 55° et 70°.

Ils ont été très étudiés, car nombreux ont été les essais d'inspiration industrielle en raison de la rapidité et de l'intensité de la fermentation. Mais en raison même de cet intérêt industriel, les recherches ont surtout porté sur le métabolisme de souches très grossièrement purifiées et non sur des souches biologiquement pures, aussi est-il très difficile d'en tirer des faits précis.

De cet ensemble de travaux (Mc Fayden et Blakall, 1899-1900, Lynn et Langwell, 1923-1930, Sarles, Scott, Fred et Peterson, 1913-1930, Veldhuis, Christensen et Fulmer, 1925) on peut conclure, en résumé, qu'il s'agit de germes dont la morphologie

générale est clostridienne, qui ont une tolérance très variable à l'oxygène, dont les uns sont cellulolytiques obligatoires et dont les autres font fermenter un certain nombre de glucides, qui utilisent l'azote ammoniacal et nitrique, mais dont le métabolisme est activé par de petites quantités d'azote organique, qui donnent des acides volatils, surtout acétique et butyrique, et de petites quantités d'éthanol. Le fait le plus important est la variabilité de ce métabolisme en fonction des conditions de culture et la possibilité de l'orienter différemment en modifiant ces conditions (essentiellement pH, aération, température).

En particulier, il est possible d'augmenter le rendement en éthanol (soufflage d'air ou abaissement de la température), ou de faire apparaître une proportion importante de sucres réducteurs (glucose) en abaissant brusquement la température à 37°, ou en acidifiant le milieu à l'acmé de la fermentation.

Des brevets ont été pris dans les industries de fermentation mais, à notre connaissance, aucune réalisation importante ne s'est montrée viable. La raison en est une question de concentration. En effet, si les rendements sont satisfaisants en acides volatils (70 p. 100 de la cellulose fermentée), les acides se trouvent à une concentration toujours faible car il s'agit de produits de métabolisme toxiques pour les bactéries ; en particulier tous nos essais pour entraîner ces germes à proliférer dans des milieux plus concentrés en sels d'acides volatils ont été négatifs.

Depuis ces études, portant sur des cultures mixtes, des auteurs ont cherché à isoler des souches à l'état de pureté : Viljoen, Fred et Peterson (1924) : *Terminosporus thermocellus*, Snieszko (1940), *Plectridium snieszkoi*, Pochon (1942), *Terminosporus thermocellulolyticus*, très proches les uns des autres et dont la pureté rigoureuse est difficile à affirmer en raison de l'absence de passage par une colonie unique. Tout récemment, Mc Bee (1948), utilisant la technique de Hungate, a obtenu une souche pure (à partir de colonies uniques) dont la description morphologique n'est pas donnée, mais dont le métabolisme est étudié : gaz carbonique et hydrogène, acides formique, acétique, lactique, succinique, éthanol, glycérol, cellobiose et glucose en fin de fermentation si la concentration initiale en cellulose est suffisante.

Enfin Balows et Tennison (1943) ont isolé une souche, incomplètement décrite, de l'intestin du Porc-épic.

Ici encore, il s'agit donc d'un groupe dont l'étude bactériologique est à peine ébauchée. Il présente cependant un intérêt considérable au point de vue agricole, car il est en partie responsable des phénomènes d'échauffement dans les silos et joue un rôle capital dans la maturation des fumiers ; il s'agit de phénomènes très complexes et fort mal connus, car les processus de cellulolyse, de protéolyse et de synthèse protéique et humique s'y intri-

quent. Le fait le plus saillant est l'existence d'un véritable cycle où agissent alternativement les thermophiles et les mésophiles (Webley). Pourtant, une connaissance plus approfondie de ces germes rendrait d'immenses services dans la préparation des fumiers artificiels dont l'importance croît chaque jour.

**LA « FONCTION CELLULOLYTIQUE » EN ANAÉROBIOSE.** — Le fait saillant qui ressort de cette longue étude des espèces cellulolytiques étudiées jusqu'à ce jour, est la diffusion du pouvoir cellulolytique dans des familles et des ordres très différents. Il n'existe pas « une » famille groupant toutes les espèces cellulolytiques. Il n'y en a pas moins entre elles des analogies frappantes au point de vue métabolique et évolutif. Ce sont elles qui permettent d'individualiser un véritable groupement physiologique ; la « fonction cellulolytique » pose partout les mêmes problèmes.

Il nous est impossible de les envisager tous ici : mécanisme et étapes de la fermentation, existence d'endo ou d'exocellulases et cellobiases, caractères d'adaptation parasitaire (dont la description a été ébauchée à propos des germes du tube digestif). Nous dirons quelques mots cependant des phénomènes évolutifs observés dans cette fonction.

Tout au long de cette revue, nous avons donné des descriptions de souches caractérisées par leur morphologie et leur biochimie (produits de métabolisme, pouvoir fermentaire, habileté à pousser sur différents milieux).

Pour ce qui est de la morphologie, nous avons déjà signalé le polymorphisme parfois déconcertant des souches considérées comme pures.

Au point de vue biologique le premier fait à mettre en évidence est le suivant : c'est la fréquence de l'association dans les cultures, d'un cellulolytique et d'un non-cellulolytique, de morphologie identique.

Second fait à rapprocher du premier : les souches qui font fermenter des sucre perdent, assez souvent, leur pouvoir cellulolytique après un ou plusieurs passages sur milieu sans cellulose. Les formes qui en dérivent ainsi se présentent alors, biologiquement, d'une façon identique aux non-cellulolytiques, associées au cellulolytique, signalées dans le cas précédent. Le fait pourrait être expliqué par l'existence de contaminants.

Nous pensons qu'il s'agit, dans les deux cas, de germes dérivant de cellulolytiques, ayant perdu ce pouvoir. Nous avons, en effet, suivi très longuement (des années), au laboratoire, un certain nombre de souches, les repiquant de façon continue, en série linéaire. Nous avons pu ainsi, dans plusieurs cas, assister à la perte lente et progressive du pouvoir cellulolytique. Les termes

extrêmes de cette évolution correspondent aux deux types, cellulolytiques et non-cellulolytiques dont nous parlions.

La souche typique, au départ, correspond à la description suivante : la cellulolyse ne se produit qu'en anaérobiose ; elle détermine un rH très bas, allant jusqu'à la réduction du rouge neutre ; repiqués sur milieux banaux (gélose Veillon profonde, quand la culture est possible), les germes donnent l'image de l'anaérobiose stricte et le rouge neutre est réduit. En milieu liquide, les sucres ne sont pas fermentés ; la gélatine est liquéfiée ; il y a formation d'indol. Après un certain nombre de repiquages, apparaissent des germes qui, dans les cultures sur milieux banaux, sont microaérophiles, réduisent lentement et incomplètement le rouge neutre, font fermenter lentement quelques sucres, forment de l'indol. L'évolution peut s'arrêter à ce stade ; elle peut également aller plus loin ; apparaissent alors des germes qui sont anaérobies facultatifs, ne réduisent pas le rouge neutre, font fermenter franchement divers sucres ; inutile de dire qu'ils ne sont pas cellulolytiques. Ces germes, dans les cultures, sont associés au cellulolytique. Cette association peut être stable ou, au contraire, le cellulolytique peut être dissocié et isolé à nouveau en culture pure.

Enfin, il faut signaler un deuxième type de phénomènes évolutifs : les souches parasites peuvent, au laboratoire, perdre plus ou moins rapidement leurs caractères d'adaptation au contenu digestif de l'hôte ; ce passage du parasitisme à la vie libre se traduit par la récupération progressive et partielle, ou même complète, du pouvoir de synthèse azotée des formes libres. Le premier terme de cette évolution est la perte de la spécificité rigoureuse du facteur de croissance (extrait du contenu digestif de l'hôte), puis ce facteur de croissance peut lui-même devenir inutile si l'azote est fourni en partie sous forme aminée. Enfin de l'azote ammoniacal, après un nombre suffisant de passages, peut suffire. Simultanément, on voit diminuer, puis disparaître, le pouvoir chromogène. Cette évolution est d'autant plus rapide que, au départ, la souche présentait des caractères parasitaires moins accentués (germes de l'intestin de xylophages par exemple). Certaines souches très adaptées, comme *Cad. cellulosae dissolvens*, sont d'une remarquable fixité. Nous avons essayé, dans ces cas, d'« entraîner » les germes à pousser dans des milieux de plus en plus pauvres en extrait. Ces essais ont été le plus souvent infructueux : le délai de cellulolyse s'allonge en même temps que le pigment pâlit ; au-dessous d'un certain taux la cellulolyse ne se produit plus.

Il va sans dire que toutes ces expériences seraient à reprendre avec des souches isolées à partir de colonies uniques sur milieux gélose-cellulose et pour lesquelles la certitude de pureté serait

plus grande, encore que les généticiens exigent, en toute rigueur, le départ d'une cellule unique. Tous les essais faits dans ce sens ont été jusqu'à présent négatifs.

Il nous semble donc sage de conclure que l'étude des anaérobies cellulolytiques, d'un intérêt pourtant considérable, est encore fort peu avancée et qu'elle pose actuellement des problèmes agricoles, pédologiques, physiologiques, industriels, bactériologiques, qui n'ont pas encore reçu de solution satisfaisante.

### BIBLIOGRAPHIE

ANKERSMIT. *Zentralbl. Bakt. I*, 1905, **39**, 559 ; 1906, **40**, 100.

BAKER. *Zentralbl. Bakt. II*, 1931, **84**, 452 ; 1933, **88**, 17. *Nature*, 1942, **149**, 220-582 ; **150**, 479.

BAKER, MARTIN. *Nature*, 1938, **141**, 877.

BALOWS, JENNISON. *J. Bact.*, 1949, **57**, 135.

BARKROFT, MC ANALY, PHILLIPSON. *J. exp. Biol.*, 1944, **20**, 120-132.

CHOUKEVITCH. *Ces Annales*, 1911, **25**, 247 ; 1913, **27**, 245.

CLAUSEN. *Zentralbl. Bakt. II*, 1931, **84**, 20.

COWLES, RETTGER. *J. Bact.*, 1931, **21**, 167.

DANIELLI, HITCHCOCK, MARSHALL, PHILIPPSON. *J. exp. Biol.*, 1945, **22**, 75.

DOUGHERTY. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1941, **99**, 110.

ELLENBERGER. *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1915, **96**, 236.

GRAY. *J. exp. Biol.*, 1947, **24**, 1 ; 1948, **25**, 135.

HAUSSNER. *Z. deut. Landwirte*, 1855, 177.

HENNEBERG. *Berl. Klin. Woch.*, 1919, 29, 693 ; *Zentralbl. Bakt. II*, 1922, **55**, 242.

HOPFEE. *Zentralbl. Bakt. I*, 1919, **83**, 374.

HUNGATE. *J. Bact.*, 1944, **48**, 499 ; 1946, **57**, 51-589 ; 1947, **53**, 631.

KELLERMANN. *Zentralbl. Bakt. II*, 1913, **39**, 502.

KELLNER, KOHLER. *Land. Vers. Stat.*, 1900, **53**, 1.

KHOUVINE. *Ces Annales*, 1923, **37**, 711 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **94**, 1072.

KOHLER. *Arch. Mikrobiol.*, 1940, **41**, 432.

LYNN, LANGWELL. *J. Soc. Chem. Industr.*, 1923, **42**, 280.

MARSTON. *Biochem. J.*, 1948, **42**, 564 ; *Austral. J. Sc. Res.*, Sér. B, 1948, **1**, 93.

MC BEE. *J. Bact.*, 1948, **65**, 653.

MC FAYDEN, BLAKAL. *Transact. Jenner Inst.*, 1949, Sér. II, 162.

MC GAUGHEY, SELLERS. *Nature*, 1948, **161**, 1014.

MEYER (R.). *Arch. Mikrobiol.*, 1934, **5**, 185 ; 1938, **9**, 80 ; 1943, **13**, 250.

MEYER (V.). *Zentralbl. Bakt. II*, 1935, **92**, 1.

OMELIAŃSKI. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, **121**, 653 ; 1897, **125**, 970.

PILGRIM. *Austr. J. Sc. Res.*, Sér. B 31, 1948, **1**, 130.

POCHON (J.). *Ces Annales*, 1935, **55**, 676 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1936, **202**, 1538 ; *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 870 ; **125**, 854 ; 1938, **127**, 997 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **208**, 1607 et 1684 ; **209**, 606 ; *Ces Annales*, 1942, **68**, 353-476 ; *Ann. des Ferment.*, 1944, **8**, 65 ; *Ces Annales*, 1941, **66**, 57.

POCHON, TCHAN. *Ces Annales*, 1947, **73**, 29.

PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de Classification des Anaérobies*; Masson, Paris, 1948.

PRÉVOT (A.-R.) et POCHON (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 166.

QUIN. *Onderst. J. Vet. Sci.*, 1943, **18**, 91.

SARLES, SCOTT, FRED, PETERSON. *Zeitschr. Bakt. II*, 1932, **435**, 401.

SARTORY, MEYER. *C. R. Acad. Sci.*, 1941, **212**, 817.

SIJPESTEIJN. *Cellulose-decomposing bacteria from the rumen of cattle*. Thèse, Leiden, 1948.

SIMOLA. *Ann. Scient.*, 1931, Sér. A, **34**.

SNIESZKO. *J. Bact.*, 1932, **23**, 71; *Zentralbl. Bakt. II*, 1933, **88**, 393; 403, 410.

TAPPEINER. *Zeitschr. Biol.*, 1883, **419**, 228.

TRAUTMANN, ASHER. *Zeitschr. Tierernähr. Futter.* 1940, **3**, 45; *Arch. Tierheilk.*, 1941, **76**, 317; *Tierern.*, 1941, **13**, 545; 1947, **14**, 545.

VARTIOVAARA, ROINE. *J. Sci. Agr. Soc. Finland.*, 1942, **14**, 127.

VARTIOVAARA, ROINE, POJARVI. *J. Sci. Agr. Soc. Finland.*, 1944, **16**, 75.

VELDHUIS, CHRISTENSEN, FULMER. *Ind. Eng. Chem.*, 1936, **28**, 430.

VILJOEN, FRED, PETERSON. *Bact. Abstracts*, 1924, **5**, 4.

WEBLEY. *Chem. and. Ind.* 1948, 201.

WERNER. *Zentralbl. Bakt.*, 1926, **67**, 297.

WINOGRADSKY. *Ces Annales*, 1929, **43**, 549.

WOODMANN. *J. Agr. Sci.*, 1922, **42**, 144.

WOODMANN, STEWART. *J. Agr. Sci.*, 1928, **17**, 713.

# LES BACTÉRIES ANAÉROBIES PECTINOLYTIQUES

par M. RAYNAUD.

(Institut Pasteur, Paris.)

## HISTORIQUE.

L'intérêt qu'a suscité l'étude des bactéries anaérobies pectinolytiques depuis de très nombreuses années est dû au rôle qui leur a été attribué dans les processus du rouissement des végétaux en général et des plantes textiles en particulier.

D'après Behrens [1] qui a fait une étude historique détaillée de la question, l'hypothèse que le rouissement du lin et du chanvre est un processus de fermentation a été exprimée dès 1852 [2]. Divers auteurs ont apporté un certain nombre d'arguments en faveur de cette conception. Hodges [3] en 1856 montre la production de  $\text{CO}_2$ , de  $\text{H}_2$ , d'acide butyrique et d'acide acétique au cours du rouissement.

Mais c'est Trécul [4, 5] qui établit le premier la présence de « végétaux extracellulaires » en forme de têtards, de cylindres ou de fuscaux au cours de la putréfaction des végétaux. Trécul donne à ces formations les noms de *Urocephalum* pour les formes en têtard, *Amylobacter* pour les formes en bâtonnets et *Clostridium* pour les formes renflées. Mais il considère que ces organismes apparaissent « spontanément » sur les plantes en putréfaction.

Nylander [6] confirme la présence des formes décrites par Trécul, mais affirme qu'elles sont de nature bactérienne. Elles sont mobiles et souvent réunies en chaînettes. Leur nature bactérienne exclut leur apparition par génération spontanée. Trécul, cependant [7], reste sur ses positions et considère les « plantules amyliifères » comme formées par transformation des cellules végétales. Il admet que l'apparition des plantules amyliifères constitue une démonstration de l'hétérogénéité qui peut, d'après lui, être définie comme suit : « une opération naturelle par laquelle la vie, sur le point d'abandonner un corps organisé, concentre son action sur quelques-unes des particules de ce corps et en forme des êtres tout différents de celui dont la substance a été empruntée ».

Si je rapporte ici ces détails historiques, c'est pour montrer combien l'établissement de faits exacts n'a pas entraîné rapi-

demment leur interprétation correcte. C'est là une particularité que nous rencontrons souvent dans l'étude des germes pectinolytiques. Malgré qu'il ait affirmé la nature bactérienne des formations décrites par Trécul, Nylander ne supposait pas que ces *Amylobacter* ou d'autres bactéries puissent jouer un rôle dans la macération des plantes.

Van Tieghem [8] admet que les formes décrites par Trécul ne sont que les états successifs d'une seule et même espèce bactérienne qu'il dénomme *Bacillus amylobacter*. Ce germe est anaérobio et dissout les parois cellulaires. Van Tieghem constate que si les parois des cellules sont attaquées, les fibres cellulaires de soutien restent intactes. Il assigne pourtant à son germe des propriétés cellulolytiques. Il travaillait probablement avec des souches impures, car nous savons aujourd'hui que le pouvoir cellulolytique est dû à des germes d'un autre type (Ome-lianski [8 bis].

Van Tieghem [9] reconnaît, par ailleurs, la parenté de *Bacillus amylobacter* avec le vibrion butyrique de Pasteur.

Prazmowski [10] montre que les *Amylobacter* (*Cl. butyricum*) n'ont pas de pouvoir cellulolytique.

La nature chimique des processus accompagnant la macération des plantes ne pouvait donc être une dissolution de la membrane cellulosique.

Kolb [11] avait montré, en 1868, qu'au cours du rouissement c'est la matière gommeuse qui entoure les fibres qui disparaît. Cette matière gommeuse qui peut être enlevée par action des alcalis dilués à chaud, ou par action de l'eau chaude sous pression, est constituée par des substances pectiques, déjà décrites par Frémy [11 bis].

Mangin [12], en 1888, montre par une étude histologique, qu'en effet la membrane cellulaire végétale comprend non seulement de la cellulose, mais aussi des substances pectiques, colorables par le rouge de ruthénium.

Les germes du rouissement n'attaquent que la pectose insoluble (protopectine) qu'ils transforment en produits solubles.

Tous les éléments étaient dès lors réunis pour trouver l'explication du processus de rouissement et il appartenait aux bactériologistes d'isoler les germes responsables de cette action particulière. L'histoire de ces découvertes bactériologiques est pourtant fort longue et il nous paraît, quant à nous, qu'elle est loin d'être terminée.

C'est Fribe [13], en 1895, qui isole le premier germe pectinolytique en culture pure.

Cet anaérobio strict, sans action sur la cellulose, se présente sous forme d'un bâtonnet sporulé à spores terminales. Il a été obtenu au cours d'expériences de rouissement réalisées au laboratoire.

Le *Plectridium* de Fribe est capable de rouir en culture pure des fragments de lin stériles. Au cours du processus on voit disparaître la majeure partie des substances dosables comme pectines dans le lin.

La description du germe n'est pas très détaillée, mais les faits mis en évidence par Fribe ont servi de point de départ à de nombreux travaux ultérieurs.

Omelianski [13 bis], qui travaillait comme Fribe dans le laboratoire de Winogradsky à Saint-Pétersbourg, a étudié en 1904 l'action comparée sur le lin du *Plectridium* de Fribe et du germe cellulolytique qu'il avait lui-même isolé. Il a montré par des examens histologiques des tiges que le bacille de Fribe réalisait la désintégration de la lamelle moyenne des cellules végétales.

Behrens [1] publie en 1902 un travail qui, en dehors d'une étude historique très complète des travaux antérieurs, apporte quelques précisions sur les caractères d'un germe de forme clostridienne, capable d'attaquer les pectines extraites du chanvre ainsi que divers glucides.

Beijerinck et Van Delden [14] isolent des eaux de rouissage un anaérobie qu'ils dénomment *Granulobacter pectinovorum*. Ce germe, mobile, Gram-positif, à spores terminales, a été assimilé au *Cl. pectinovorum* de Donker [15] par Weizmann et Hellinger [16]. D'après ces auteurs, *Granulobacter pectinovorum*, non gélatinolytique, ne peut pas être identifié au *Plectridium pectinovorum* décrit par Störmer dont nous parlons plus loin.

Si l'on s'en tient à la description originale de Beijerinck et Van Delden [14] et non aux études ultérieures de Donker [15], *Granulobacter pectinovorum* est gélatinolytique. Il est capable d'attaquer les protéines végétales. Beijerinck et Van Delden insistent même sur le rôle que les propriétés protéolytiques jouent dans le processus de concurrence entre *Granulobacter pectinovorum* et les autres anaérobies butyriques au cours de la macération des plantes. Les butyriques ordinaires (*Cl. butyricum* Prazmowsky) non protéolytiques ont besoin d'azote soluble pour se développer. *Granulobacter pectinovorum* peut croître aux dépens des protéines végétales et c'est ce qui expliquerait son accumulation sur les tiges de lin au cours du rouissage.

Nous pensons donc avec Prévot [16 bis], qu'il est juste d'attribuer à Beijerinck et Van Delden la priorité dans la description de *Plectridium pectinovorum*.

Le problème relatif à ce germe, comme d'ailleurs celui de la distinction des sous-groupes parmi les anaérobies pectinolytiques a été en effet considérablement obscurci par des assimilations arbitraires de souches. C'est ainsi que certains auteurs assimilent *Pl. pectinovorum* (Beijerinck et Van Delden) à *Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann.

Bredemann [17], dans un très volumineux travail sur les bactéries anaérobies butyriques identifie entre eux les divers types antérieurement décrits. Étudiant surtout la fermentation butyrique, il néglige les différences entre souches. C'est ainsi que *Granulobacter pectinovorum* (Beijerinck et van Delden) est considéré comme ne liquéfiant pas la gélatine et rattaché à *Cl. butyricum* (Prazmowsky) par certains auteurs.

Nous verrons plus loin que tant sur la base morphologique (spores plectridiennes) que sur la base des propriétés biochimiques, cette assimilation n'est pas justifiée.

Nous avons en particulier étudié une souche étiquetée *Cl. pectinovorum* de la National Collection of Type Culture (N° 3723) ; elle présente des spores terminales et liquéfie la gélatine lentement il est vrai (en douze jours). Elle peut donc bien être assimilée à *Plectridium pectinovorum*.

Stoermer [18] fait, en 1904, une étude d'ensemble du rouissement du lin à l'eau. Il décrit les modifications histologiques et chimiques de la plante au cours du processus. Il donne une technique d'isolation sur plaques de gélatine permettant d'obtenir des cultures pures. Il rapporte en détail les caractères du germe responsable du rouissement qu'il appelle *Plectridium pectinovorum*.

Il s'agit d'un bâtonnet mobile, Gram-positif, de 10 à 15  $\mu$  de long sur 0,8 à 1  $\mu$  de large, présentant des granulations colorables en bleu par l'iode. Les spores ovales sont terminales. Stoermer décrit ce germe comme anaérobie facultatif parce qu'il peut pousser en présence d'air libre dans certains milieux. En fait, la pression partielle d'air compatible avec la croissance est faible (15 mm.) et *Plectridium pectinovorum* ne donne jamais de culture en surface en présence d'air libre. C'est donc un anaérobie strict au sens actuel du terme. Lors de la fermentation des sucres, il forme du  $\text{CO}_2$ , de l' $\text{H}_2$ , les acides butyrique et acétique (et parfois un peu d'acide valérianique), de l'acide lactique. Il ne donne que des traces d'alcools.

Le germe est gélatinolytique, mais l'attaque de la gélatine est lente, ce qui permet d'isoler le germe sur plaques de gélatine. Les premiers jours, en effet, les colonies sont petites et la gélatine reste intacte. Ce n'est qu'au bout de plusieurs jours, lorsque les colonies sont volumineuses, que la gélatinolyse devient apparente. La description détaillée de Stoermer permet de fixer les caractères essentiels de l'espèce *Plectridium pectinovorum* (Stoermer) et de conclure à son identité très probable avec *Granulobacter pectinovorum* (Beijerinck et Van Delden).

Ce germe a été retrouvé par Ruschmann et Bavendamm [19] qui l'appellent *B. amylobacter liquefaciens* (*Pl. pectinovorum*). L'identité du germe décrit par ces auteurs avec *Pl. pectinovorum* paraît probable. C'est aussi l'avis de Weizmann et Hellinger [16].

Sjolander et McCoy [20] qui ont étudié une souche de Ruschmann et Bavendamm n'ont pu mettre en évidence ses propriétés pectinolytiques.

Weizmann et Hellinger en 1940 [21] ont isolé 3 souches de *Pl. pectinovorum* à partir de jute palestinien (P. J.) de chanvre indien (I. H.) et de lin indien (I. F.). Ils en ont donné une étude détaillée. Seule une souche (I. F.) attaquait sûrement la pectine de citron. Pour les deux autres, l'attaque était très faible et sa signification discutable d'après les auteurs.

Notons enfin que les processus chimiques qui accompagnent le rouissage ont fait l'objet de nombreux travaux parmi lesquels nous citerons ceux, relativement récents, de Lüdtke [21 bis] et de Lüdtke et Felser [21 ter]. De cette brève revue historique nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Les anaérobies non pigmentés décrits comme pectinolytiques dans la littérature présentent de très grandes analogies. S'ils se rapprochent au point de vue de leur activité fermentaire des bactéries butyriques de type *Cl. butyricum* (Prazmowski), ils s'en différencient nettement au point de vue morphologique. Il s'agit de bâtonnets allongés, à spores *terminales*, donnant par fermentation des sucres, principalement, en dehors de  $H_2$  et  $CO_2$ , les acides butyrique et acétique et peu ou pas de solvants neutres comme *Cl. butyricum*. Ils sont lentement gélatinolytiques. Leur activité pectinolytique est toujours assez faible. Nous pensons donc qu'on peut décrire sous le nom de *Plectridium pectinovorum* les germes suivants :

*Plectridium* de Fribe ;

*Plectridium pectinovorum* de Störmer ;

*Granulobacter pectinovorum* de Beijerinck et van Delden ;

*Plectridium* (*Cl.*) *pectinovorum* de Weizmann et Hellinger.

Markowa [25 bis] a isolé un microbe anaérobiose distinct de *Cl. felsineum* et de *Pl. pectinovorum* et capable de rouir à froid les plantes textiles. Nous n'avons pas pu avoir connaissance des caractères bactériologiques de cette espèce nouvelle.

Le problème de la pectinolyse a fait un progrès décisif avec la découverte, en 1916, par Carbone [22] d'un anaérobiose pigmenté pectinolytique, *Clostridium felsineum*, d'abord décrit comme aérobiose, car il peut pousser en présence d'air lorsqu'il est associé à des organismes aérobies. Sa nature anaérobiose fut reconnue en 1917 par Carbone et Tombolato [22 bis]. Carbone a, par la suite, publié divers travaux sur ce germe [22 ter].

Ruschmann et Bavendamm [19], en 1925, en ont fait une étude détaillée. Ruschmann et Bartram [23], en 1942-1943, ont apporté des précisions sur son rôle dans le rouissage.

Il a été isolé en Argentine par Sordelli et Soriano [24], en U. R. S. S. [25], en Amérique du Nord par McClung [23 ter].

Toute une série d'anaérobies pigmentés pectinolytiques analogues ont été décrits par la suite :

- Cl. haumannii* par Soriano en 1930 [26] ;
- Cl. roseum* par McCoy et McClung en 1935 [27] ;
- Cl. corallinum* par Prévot et Raynaud en 1944 [28] ;
- Cl. aurantibutyricum* par Hellinger en 1947 [29] ;
- Cl. saturni rubrum* par Prévot en 1946 [30].

McClung [30 bis, 30 ter] a donné en 1942 une technique générale d'isolement de ces germes. Il préconise comme milieu la bouillie de germe de blé à 5 p. 100 sur laquelle la formation de pigment serait régulière et facile à reconnaître. Tous ces anaérobies pigmentés forment un groupe assez homogène.

Morphologiquement ce sont des Clostridies, à spore centrale ou subterminale avec souvent un faux aspect plectridial dû à la position excentrique de la spore.

Physiologiquement ils donnent tous des pigments. La couleur varie du jaune au rouge. L'apparition du pigment est souvent assez tardive ; elle se fait dans des conditions variables suivant les espèces. Enfin, le pouvoir chromogène se perd souvent à la suite de trop nombreux repiquages.

Au point de vue métabolique, ces germes attaquent les sucres en donnant de l'acide butyrique, de l'acide acétique, du butanol et de l'acétone. Ils se rapprochent donc de *Cl. acetobutylicum* (Weizmann). Mais leur pouvoir fermentaire présente une intensité variable suivant les souches et la quantité de solvants neutres formée reste faible. Tous sont considérés comme pouvant attaquer la pectine. Cependant, la recherche de cette activité métabolique particulière présente un certain nombre de difficultés et les résultats rapportés dans la littérature ne sont pas toujours nets. Pour un certain nombre d'entre eux, on a établi parallèlement leur pouvoir rouissant. Nous nous proposons de rapporter brièvement les caractères de ces différents germes tels qu'ils sont décrits dans la littérature.

Nous ferons ensuite une revue des procédés de recherche de l'activité pectinolytique des bactéries anaérobies. Nous terminerons en exposant les résultats de quelques travaux personnels relatifs à l'activité pectinolytique de certains de ces germes, travaux inédits, qui ont été effectués avec la collaboration de M. Brugières et de M<sup>me</sup> Saissac dans le laboratoire d'A.-R. Prévot, et qui doivent faire l'objet d'une publication ultérieure [54].

*Plectridium pectinovorum* Beijerinck et Van Delden (1902).

*Synonymes.* — *Granulobacter pectinovorum* Beijerinck et Van Delden (1902).

*Plectridium pectinovorum liquefaciens* (*Bacillus amylobacter* A. M. et Bredemann), Ruschmann et Bayendamm (1925).

*Clostridium pectinovorum* (*Plectridium*) Weizmann et Hellinger (1940).

Nous ne referons pas d'étude historique particulière pour *Pl. pectinovorum*, car celle-ci a été effectuée au chapitre introductif.

Les caractères que nous décrivons sont rapportés d'après Beijerinck et Van Delden [14], Stoermer [18], Ruschmann et Bayendamm [19, 19 bis], Sjolander et McCoy [20], Weizmann et Hellinger [21]. Nous y ajouterons quelques observations personnelles, faites avec la souche n° 3723 de la National Collection of Type Culture et avec la souche P. J.

*Origine. Isollement.* — Ce germe a été isolé à partir de liquides de rouissement (Beijerinck et Van Delden, Stoermer). On peut aussi ensemencer directement des fragments de tige de lin dans un milieu à base de bouillie de blé [Weizmann et Hellinger] (1).

Les divers auteurs précédents ont fait les isolements sur gélose inclinée en anaérobiose : gélose au mout de bière +  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , gélose glucosée à l'eau de levure.

*Morphologie.* — Bâtonnets minces, isolés le plus souvent ou en courtes chaînettes, parfois bâtonnets incurvés.

Spores ovalaires terminales (Beijerinck et Van Delden avaient, dans leur texte, décrit ces spores comme subterminales, mais les photographies qu'ils ont publiées montrent que les spores de leur germe étaient bien terminales).

Dimensions variables :

Beijerinck et Van Delden :

Formes végétatives : 10 à 15  $\mu$   $\times$  0,8  $\mu$ .  
Spores : 1,8  $\mu$   $\times$  1,2  $\mu$ .

Weizmann et Hellinger :

Formes végétatives : 2 à 4,7  $\mu$   $\times$  0,5 à 6  $\mu$ .  
Spores : 1,8 à 2,3  $\mu$   $\times$  1,1 à 1,3  $\mu$ .

Gram-positif en culture jeune.

Granulations iodophiles : jaunes dans les cellules jeunes et bleu violet dans les formes plectridiennes.

*Physiologie.* — Anaérobiose strict. Mobile (cils périthriches).

Résiste cinq minutes à 100°.

Réduit la phénosafranine, la safranine et le rouge neutre.

Cultive entre 20° et 45°, avec optimum à 37°.

Ne contient pas de catalase (Weizmann et Hellinger).

(1) Nous sommes heureux de remercier ici M. Weizmann et M<sup>le</sup> Hellinger de l'envoi qu'ils ont bien voulu nous faire de deux de leurs souches *Pl. pectinovorum* P J et *Cl. aurantibutyricum*.

*Cultures.* — Gélose inclinée à l'extrait de levure : développement faible en vingt-quatre heures, petites colonies transparentes.

Gélose inclinée glucosée à l'extrait de levure : bon développement, colonies volumineuses, arrondies, irrégulières, de type lisse ou compactes d'aspect cireux.

Ces colonies peuvent atteindre 5 mm. en quarante-huit heures.

La colonie se détache facilement de la gélose et peut être enlevée en « masse » avec l'ose.

Gélose profonde (milieu VF glucosé ou gélose au bouillon de pomme de terre glucosé).

Colonies en agrégats de lentilles, volumineuses, gaz abondant.

Eau peptonée : développement faible.

Bouillon VF glucosé : trouble abondant, gaz, puis dépôt.

Bouillie de maïs : fermentation rapide, action amylasique partielle, gaz abondant, odeur butyrique.

Bouillie de pomme de terre : bon développement, gaz, odeur butyrique.

Gélatine : en vingt-quatre heures, développement modéré et pas de liquéfaction. Celle-ci ne se manifeste en général qu'au bout de quelques jours.

Avec la souche n° 3723, il fallait douze à quinze jours. Cette lenteur de la liquéfaction de la gélatine peut expliquer, peut-être, les résultats négatifs rapportés par certains auteurs.

Il est aussi possible que des souches très anciennes maintenues dans des collections aient perdu éventuellement tout pouvoir gélatinolytique.

Production d' $H_2S$  : très faible, ne peut être mise en évidence qu'à condition de la rechercher à l'ouverture de tubes scellés par le papier à l'acétate de plomb. Sur gélose à l'extrait de levure glucosée et additionnée d'acétate de plomb il ne se forme pas de colonies noires.

Les protéines coagulées (blanc d'œuf-fibrine) ne sont pas attaquées.

*Pl. pectinovorum* n'est donc pas un germe protéolytique actif, mais il est capable de liquéfier la gélatine et de digérer partiellement la caséine du lait. Weizmann et Hellinger considèrent ce caractère comme très important, car il permet de rapprocher *Pl. pectinovorum* de *Cl. acetobutylicum*. Ce dernier cependant liquéfie en général la gélatine de façon beaucoup plus active.

Lait rapidement coagulé avec dégagement abondant de gaz. Le caillot est d'abord rétracté et le sérum surnageant clair. Puis le caillot est dissocié par le dégagement gazeux. Les dosages chimiques montrent que la caséine est digérée partiellement.

Les nitrates ne sont pas réduits en nitrites.

De nombreux sucres sont attaqués avec dégagement de gaz et acidification.

Weizmann et Hellinger : sucres fermentés : arabinose, xylose, glucose, galactose, mannose, lévulose, lactose, saccharose, rhamnose, amidon, dextrine, salicine, sorbitol.

Sucres non fermentés : érythritol, esculine, mannitol.

Corps faiblement attaqués (résultats douteux) : glycérol, inuline, lactate de Ca, cellulose, pectine.

McCoy, Fred, Peterson, Hasting [31] ont trouvé, en plus des sucres fermentés cités ci-dessus, les sucres suivants : tréhalose, inuline, glycogène, mannitol, esculine.

Par contre, ne sont pas attaqués : amygdaline, quercitol, cellulose et pectine.

L'attaque de la pectine en solution dans le milieu paraît nulle ou négligeable au laboratoire. McCoy et al. [31] avec la souche Kluyver, Sjolander et McCoy [20] avec la souche de Ruschmann n'ont noté aucune attaque. Weizmann et Hellinger n'ont observé de fermentation, d'ailleurs faible, qu'avec une souche (I. F.) sur trois.

Nous-même n'avons observé qu'une attaque légère de la pectine avec la souche P. J. Par contre, les souches isolées par Ruschmann et Bartram [23] étaient toutes capables de rouir les fragments de tige de lin stériles. Les fibres obtenues par action de *Pl. pectinovorum* présentaient une couleur foncée (alors que celles obtenues avec *Cl. felsineum* ont une couleur claire). Dans la nature, *Pl. pectinovorum* serait l'agent principal du rouissement en eau froide, d'après Ruschmann.

*Produits formés lors de la fermentation des glucides.* — Sur milieu à l'autolysat de levure additionné d'asparagine et de 2 p. 100 de glucose, Weizmann et Hellinger ont trouvé une attaque assez faible du sucre (9 à 16 p. 100 de glucose fermenté) avec formation des produits suivants : acétone, isopropanol, ethanol, acides butyrique, acétique et lactique. Ils ont observé un balancement entre la production d'acide lactique et d'acides volatils (d'acide acétique principalement). La souche I. F., qui donne davantage d'acide lactique, produit moins d'acide acétique. Ils n'ont obtenu ni acide formique, ni acétyl-méthyl-carbinol. En présence de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ , l'attaque du glucose est beaucoup plus intense, allant jusqu'à 74 ou 100 p. 100, ce qui démontre la sensibilité du germe à la réaction acide du milieu. Les acides constituent les produits terminaux les plus abondants de la fermentation. La production de solvants neutres reste toujours faible.

Dans les milieux additionnés de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  il se forme de faibles quantités d'acide formique, mais toujours pas d'acétyl-méthyl-carbinol. Sur milieu à 2 p. 100 de pectine, Enebo et coll. [53] ont trouvé qu'il se formait des acides acétique et butyrique avec

des traces d'acide formique. L'acide acétique est le plus abondant.

Sur milieu VF glucosé nous avons pu mettre nous-même en évidence, avec les souches utilisées, les acides butyrique et acétique avec traces d'acide formique, et de l'acide lactique. Ni indol ni acéthyl-méthyl-carbinol.

Sur milieu à 1 p. 100 de peptone et 2 p. 100 de pectine de pomme, nous avons observé un développement abondant avec formation d'acides butyrique et acétique (acétique/butyrique = 4,5/1) et d'acide lactique.

*Pl. pectinovorum* est dépourvu de tout pouvoir pathogène.

#### RÉSUMÉ. CONCLUSIONS.

Pour Weizmann et Hellinger, qui considèrent avec les bactériologues américains que la différence morphologique entre *Clostridium* et *Plectridium* n'est pas suffisante pour créer sur cette base deux genres distincts, le problème se pose de situer *Pl. pectinovorum* dans le groupe des Clostridies butyriques. Ils sont amenés à le différencier de *Cl. butyricum* Prazmowski et de *Cl. acetobutylicum*. *Pl. pectinovorum* (*Cl. pectinovorum*) forme pour eux un groupe intermédiaire entre les deux types précédents.

Il se rapproche de *Cl. acetobutylicum* par son pouvoir de liquéfier la gélatine et de digérer la caséine, mais s'en distingue par le fait qu'il ne produit que des quantités négligeables de solvants neutres (acétone et butanol) sur bouillie de céréales, ce dernier caractère le rapprochant de *Cl. butyricum*.

Ces auteurs estiment que les germes qu'ils ont décrits sont identiques au *Plectridium* de Friebes, à celui de Störmer (et nous ajouterais à *Plectridium pectinovorum liquefaciens* de Ruschmann et Bavendam), mais, par contre, peuvent être distingués de *Granulobacter pectinovorum* Beijerinck et Van Delden, qui ne liquéfie pas la gélatine.

Avec A.-R. Prévot, qui établit sa classification des anaérobies sur une base morphologique prédominante, pour la différenciation des grands groupes, nous estimons que par sa morphologie, *Pl. pectinovorum* doit être distingué des Clostridies butyriques. Nous apportons ainsi un argument en plus en faveur de la différenciation de cette espèce ou de ce groupe, suivant l'opinion de Weizmann et Hellinger basée, elle, principalement, sur des arguments physiologiques et biochimiques.

Faisons à ce sujet une remarque d'ordre général. Les groupes que l'on peut constituer sur une base biochimique pure sont le plus souvent hétérogènes. Nous n'en voulons pour preuve que la difficulté qu'ont rencontrée tous les bactériologues à classer les

anaérobies butyriques, en particulier ceux du groupe *Cl. butyricum*.

Il faut déjà, pour donner à ce groupe une signification, en éliminer toutes les clostridies pathogènes qui donnent aussi de l'acide butyrique et de l'acide acétique en culture. Or, sur le plan biochimique, le caractère pathogène ne constitue pas un caractère facile à définir. C'est donc pour des raisons de commodité et de tradition qu'on l'utilise pour réservé le nom de butyrique à des souches non pathogènes présentant certaines propriétés techniques.

Il nous paraît probable que ce groupe n'est encore confus que parce qu'il est mal connu et que seules certaines propriétés ont été étudiées en détail. Nous pensons qu'il sera démembré lorsque le mécanisme même de la fermentation butyrique sera mieux connu et que les différentes propriétés de ces germes auront été davantage étudiées.

En conclusion, *Plectridium pectinovorum* est une espèce bien définie par ses caractères morphologiques et biochimiques.

Morphologiquement : germe mobile, Gram-positif, présentant des granulations iodophiles, spores ovalaires terminales.

Au point de vue biochimique : germe liquéfiant la gélatine, coagulant le lait, fermentant de nombreux glucides, en particulier l'amidon, en donnant comme produits principaux les acides butyrique, acétique et lactique, avec des traces d'acide formique et de faibles quantités de solvants neutres : butanol, éthanol, acétone, isopropanol.

Son pouvoir rouissant est facile à mettre en évidence. Son activité pectinolytique *in vitro* est faible.

#### *Clostridium felsineum* Carbone, 1916.

*Historique.* — *Cl. felsineum* a été découvert par Carbone, en 1916 [22], au cours d'études sur la macération des plantes textiles. Sa nature d'anaérobie strict, d'abord méconnue, a été établie en 1917 par Carbone et Tombolato [22 bis]. Les études des bactériologistes italiens ont été inspirées surtout par des mobiles techniques. Ils ont insisté particulièrement sur son rôle comme agent actif de rouissage.

Ruschmann et Bayendamm, en 1925 [19, 19 bis], ont apporté des précisions sur les caractères de *Cl. felsineum* et son intervention dans le rouissage.

Il a été isolé par la suite en Argentine par Sordelli et Soriano, en 1928 [24, 24 bis, 24 ter].

Il faut savoir que la souche initiale de Carbone n'étant pas disponible, les études des auteurs non italiens ont porté sur des

souches isolées par eux et assimilées à *Cl. felsineum*, d'après la description de Carbone.

McCoy et McClung, 1935 [27], ont étudié *Cl. felsineum* pour le comparer au nouvel anaérobie chromogène qu'ils avaient découvert (*Cl. roseum*). McCoy et Peterson [32] ont recherché son pouvoir pectinolytique avec des résultats négatifs. Potter et McCoy, en 1947 [33], ont montré que *Cl. felsineum* fermente en réalité la pectine en culture pure.

Anna D. Orla-Jensen et Kluyver, en 1940 [34], ont isolé *Cl. felsineum* des eaux de rouissement de divers routoirs de Hollande et de Belgique et admettent qu'il est l'agent actif du rouissement, tant à chaud qu'à froid dans ces deux pays.

Ruschmann et Bartram, en 1942-1943 [23, 23 bis], ont repris minutieusement l'étude du rouissement et précisé les rôles respectifs de *Pl. pectinovorum* et *Cl. felsineum*. A noter cependant que dans leurs recherches sur le nombre de germes actifs, ils identifient *Cl. felsineum* de façon sommaire, considérant que toute colonie de germe anaérobie pigmentée en jaune orangé ou rouge est une colonie de *Cl. felsineum*. Le présent travail montre qu'une telle identification est insuffisante car il existe de nombreux anaérobies pigmentés pectinolytiques distincts les uns des autres.

Les bactériologistes russes ont publié, de 1939 à 1942, une série de travaux sur *Cl. felsineum* [25].

Les caractères de *Cl. felsineum* sont rapportés ici d'après Carbone [22], Sordelli et Soriano [24], Ruschmann et Bavendamm [19], Ruschmann et Bartram [23].

*Morphologie.* — Bâtonnets droits, isolés ou en courtes chaînettes.

Dimensions : 3 à 4  $\mu$   $\times$  0,5 à 0,7  $\mu$  (Carbone), 2,2 à 2,8  $\mu$   $\times$  0,6 à 0,7  $\mu$  (Sordelli et Soriano).

Très mobiles en culture jeune, cils périthriches.

Sporulation facile sur certains milieux (pomme de terre, lin).

Tous les auteurs sont d'accord pour lui décrire des spores clostridiennes, mais ils ajoutent que dans certains cas les spores sont terminales, plectridiennes (*Cf.*, en particulier Sordelli et Soriano, Ruschmann et Bavendamm).

Cependant, si l'on s'en tient à la définition que donne Prévot des plectridies, il est facile, en examinant les photographies publiées par ces auteurs, de voir que les spores sont en réalité subterminales. Le sporange a par ailleurs, dans ce cas, un aspect particulier en forme de lance; à cause d'une excroissance terminale effilée.

Dimensions de la spore : 1,2 à 2  $\mu$   $\times$  0,8 à 0,9  $\mu$  ou 2 à 2  $\mu$   $\times$  1,5  $\mu$ .

Décrit par Carbone comme Gram-négatif, *Cl. felsineum* est en réalité Gram-positif (Ruschmann et Bavendamm, Sordelli et

Soriano), mais il est Gram fragile et devient vite Gram-négatif par vieillissement.

Il présente des granulations colorables en bleu par l'iode.

*Physiologie.* — C'est un anaérobiose très strict. Sa température optima de croissance est 37° et ce caractère jouerait un rôle important dans sa prédominance dans le rouillage à chaud. Ses spores résistent une minute à 100°. Lorsqu'il vient d'être isolé, il ne pousse pas sur les milieux ordinaires à base de viande. La souche que nous avons étudiée (NCTC n° 3220), quoique poussant mieux sur milieux végétaux, se développait sur bouillon VF glucosé. Ce fait est probablement en rapport avec la longue conservation artificielle qu'a subie cette souche.

*Caractères culturaux.* — Gélose-carotte profonde et gélose au lait : colonies floconneuses orangées brunissant par la suite.

Gélose-carotte en surface : colonies orangées, circulaires quand elles sont jeunes, puis à bords ondulés par la suite.

Eau de levure gélosée glucosée en surface : colonies orangé jaune ou orangé brun. On peut les enlever d'une seule pièce, leur masse visqueuse formant bloc.

Gélatine : liquéfiée rapidement.

Bouillie de pomme de terre : culture rapide, dégagement gazeux abondant. La partie solide du milieu se rassemble en une masse mucilagineuse qui, en vingt-quatre ou quarante-huit heures, monte à la surface, entraînée par les gaz. Dans le liquide trouble on observe de longs filaments. La pomme de terre prend une coloration *rouge intense*.

Jus de carotte : développement abondant. Il se forme à la surface des masses d'aspect muqueux d'où descendent de longs filaments (*phytoglée*). Par la suite, cette masse se rassemble dans le fond du tube sous forme d'un dépôt grumeleux.

Fragments de lin stériles immersés dans l'eau. Fermentation abondante, dégagement gazeux sous l'épiderme. En deux à trois jours les fibres se séparent.

Les souches de *CL. felsineum* conservées sur milieu à la pomme de terre ou au lin peuvent à la longue se développer sur milieu à base de viande : bouillon simple, bouillon glucosé (Sordelli et Soriano), bouillon VF. Mais il faut, en général, pratiquer des ensemencements larges pour obtenir le départ de la culture.

Lait : fermentation énergique. Coagulation en deux ou trois jours. Gaz, caillot rétracté et coloré en jaune orangé.

Glucides attaqués avec dégagement de gaz et formation d'acides (Sordelli et Soriano) : arabinose, xylose, glucose, lévulose, mannose, galactose, maltose, saccharose, lactose.

N'attaque pas : mannitol, dulcitol, sorbitol, glycérol, arabitol, inositol, salicine, amygdaline, rhamnose, rafinose, inuline, amidon.

*Amidon.* — L'amidon n'est pas fermenté en tube. Sordelli et

Soriano pensent qu'il est utilisé une fois que le développement de la culture a commencé, parce qu'en purée de pomme de terre la réaction à l'iode de l'amidon disparaît en un à deux jours.

McCoy et McClung [27] notent de même qu'en bouillie de blé à 5 ou 8 p. 100, il ne reste plus d'amidon résiduel en quatre à cinq jours : il se forme des acides et des solvants neutres.

L'amidon cru pourtant paraît ne pas être fermenté. Sur la pomme de terre, *Cl. felsineum* agirait en dissolvant la zone pectique de la paroi cellulaire. Carbone a même proposé un procédé industriel de fabrication de la féculle de pomme de terre par fermentation par *Cl. felsineum*.

Bytschkowskaya [25] affirme que *Cl. felsineum* fermente l'amidon énergiquement et attaque la pomme de terre crue.

La fermentation de l'amidon est formellement niée par Carbone.

Il nous paraît probable que certaines de ces divergences apparemment inconciliables proviennent simplement de différences de terminologie, certains auteurs considérant comme *Cl. felsineum* tout anaérobie pigmenté pectinolytique isolé à partir d'eaux de rouissement.

*Biochimie.* — En ce qui concerne les corps formés lors de l'attaque des sucres, les résultats diffèrent suivant les auteurs. D'après Carbone, puis Ruschmann et Bavendamm, le seul acide volatil trouvé est l'acide acétique. Pour Ruschmann et Bavendamm, l'acide butyrique, lorsqu'on en trouve, serait dû à une contamination par association de *Pl. pectinovorum*.

Pour Van der Lek [36] *Cl. felsineum* donne les produits suivants : acides butyrique et acétique, butanol, éthanol, isopropanol. McCoy et McClung ont trouvé de l'acétone, du butanol, de l'éthanol.

Avec la souche n° 3220 nous avons nous-même trouvé les acides butyrique et acétique.

Bytschkowskaya [25] a décelé aussi de l'acide butyrique.

Enebo et al. [53], en milieu à 2 p. 100 de pectine, ont identifié l'acide acétique et l'acide butyrique.

*En résumé*, on doit considérer que *Cl. felsineum* donne comme produits principaux de fermentation les acides butyrique et acétique, du butanol, de l'éthanol, de l'acétone et de l'isopropanol. Avec la souche n° 3220 nous avons pu constater que les nitrates ne sont pas réduits en nitrite. Il se forme de l'indol, de l' $\text{H}_2\text{S}$ , de l'acide lactique et de l'acétyl-méthyl-carbinol.

La présence de ce dernier corps avait déjà été signalée par Van der Lek [36].

*Cl. felsineum* pousse sur milieu semi-synthétique en ayant besoin comme facteurs de croissance de biotine et d'acide para-amino-benzoïque comme *Cl. acetobutylicum* : Lampen et Peterson [35]. Le pigment de *Cl. felsineum* est orangé jaune ou

orangé rouge suivant le milieu. Il se forme aussi bien en anaérobiose qu'en présence d'air. Il est lié aux corps bactériens et ne diffuse pas ou peu dans le milieu. En présence d'air sa couleur change : il brunit ou noircit.

*Pouvoir rouissant.* — Le pouvoir rouissant de *Cl. felsineum* semble bien établi par les études diverses effectuées sur végétaux : pomme de terre, carottes, tiges de lin et de chanvre. Ces études montrent que ce germe est capable de détruire la substance des lamelles moyennes.

Ruschmann et Bavendamm [19], Ruschmann et Bartram [23], et après eux les auteurs russes [25], ont insisté sur le fait que *Cl. felsineum* serait l'agent du rouissage à chaud spontané du lin dans lequel *Pl. pectinovorum* n'interviendrait pas ou peu. Ce dernier germe serait par contre l'agent du rouissage à froid.

Orla-Jensen (Anna D.) et Kluyver [34] ont confirmé la grande fréquence de *Cl. felsineum* dans les eaux de route en Hollande et en Belgique. McClung [23 ter] a montré de plus que *Cl. felsineum* se rencontrait avec fréquence dans les boues et le sol de l'état d'Indiana.

Nous pensons, personnellement, que le groupe des anaérobies pectinolytiques comprend de nombreuses espèces voisines, mais distinctes les unes des autres. Le rouissage des plantes textiles est très probablement leur œuvre, mais ces germes doivent aussi intervenir dans un processus naturel beaucoup plus important, à savoir la destruction des matières pectiques, stade essentiel du pourrissement des végétaux. Il en résulte que le rouissage technique, tel qu'il est réalisé empiriquement, doit être assuré suivant les pays et même les régions par des espèces différentes, ce qui rend compte de la grande variabilité observée.

Si l'on tient à préciser le rôle exact des différentes espèces dans le rouissage naturel, il y aurait lieu de faire une étude d'ensemble des eaux de rouissage de différents pays en procédant à une identification méthodique des germes isolés.

*Pouvoir pectinolytique « in vitro ».* — *In vitro*, avec des solutions de pectine stérilisée, les résultats ont été longtemps contradictoires, soit parce que les pectines employées étaient partiellement dégradées, soit parce que les souches utilisées, isolées depuis trop longtemps, avaient perdu leur activité. L'absence de pouvoir pectinolytique a été notée par divers auteurs.

En 1928, McCoy et Peterson [32] avaient conclu que *Cl. felsineum* n'attaquait pas la pectine : les tests d'attaque du substrat étaient le dégagement gazeux et la mesure de l'acidité titrable finale.

En recherchant les solvants neutres formés, McCoy et McClung [27] notent une faible activité pectinolytique pour *Cl. felsineum*.

En 1947, cependant, Potter et McCoy [33] établissent sur des tests chimiques sûrs, que *Cl. felsineum* attaque la pectine *in vitro* : en vingt-quatre heures il fait disparaître 80 p. 100 de la pectine du milieu.

En ce qui concerne *Cl. felsineum*, il y a donc maintenant accord entre les résultats obtenus par les tests qualitatifs sur les plantes textiles et la mesure expérimentale directe du pouvoir d'attaque vis-à-vis de solutions de pectine.

Au point de vue sérologique, les études de Sordelli et Soriano [24 bis] ont montré que *Cl. felsineum* est distinct de *Cl. haumanni* et d'une souche de butyrique (*B. amylobacter*).

McCoy et McClung [27 bis] ont trouvé des rapports plus complexes entre *Cl. acetobutylicum*, *Cl. felsineum* et *Cl. roseum*. Chaque germe se différencie par des antigènes H spécifiques propres. *Cl. acetobutylicum* et *Cl. roseum* possèdent de plus un antigène H commun, que n'a pas *Cl. felsineum*. Les trois germes ont un antigène O commun.

Quoique sérologiquement distinctes, ces trois espèces présentent donc une parenté sérologique indiscutable.

*Cl. felsineum* est dépourvu de tout pouvoir pathogène,

#### *Clostridium haumanni* Soriano [26].

Origine : eaux de rouissage en Argentine.

D'abord nommé *Plectridio amarillo*, il reçut comme nom définitif *Clostridium haumanni*.

**Morphologie.** — Bâtonnet Gram-positif, mobile. Isolé ou en chaînettes courtes : 3 à 12  $\mu$   $\times$  0,6-0,9  $\mu$  suivant les milieux. Spores ovales. Sporange terminé par une protubérance terminale. La position subterminale de la spore l'a fait décrire comme un *Plectridium*. Si l'on s'en tient à la définition de A.-R. Prévot, il s'agit d'un *Clostridium* à spore subterminale.

Gram-positif en culture jeune. Ne contient pas de granulations colorables en bleu par l'iode, mais seulement de rares granulations colorables en jaune. Cependant, dans certaines formes jeunes, Soriano a pu observer un ou deux granules colorables en bleu par l'iode.

**Physiologie.** — Anaérobie strict. Température optima de croissance, 37°. Pousse encore à 18°. Les spores résistent à un chauffage d'une minute à 100°.

**Caractères culturaux.** — Il ne pousse pas sur les milieux à base de viande, simples ou sucrés.

Isolement : sur gélose-carotte à 1,8 p. 100 de gélose.

Gélose-carotte : en vingt-quatre heures, petites colonies, gaz abondants, fragmentant la gélose. Les colonies se pigmentent en quelques jours en jaune canari, le pigment diffuse facilement

dans le milieu, et se forme sur toute la hauteur de la gélose. La présence d'air ne paraît pas indispensable à son apparition. Lorsque la culture vieillit, la couleur devient rouge, mais est toujours très différente de la teinte de *Cl. felsineum*.

Les colonies isolées en gélose-carotte sont lenticulaires le plus souvent : parfois colonies ramifiées.

Gélose molle à la carotte (0,3 p. 100 de gélose) : trouble et gaz en vingt-quatre heures, au bout de huit à quinze jours coloration rouge.

Jus de carotte neutralisé : trouble uniforme en vingt-quatre heures, gaz, acidification.

Liquide de Speakmann, gélosé à 3 p. 100 : pas de pigment en général.

Gélatine au moût de malt : gaz, pas de liquéfaction.

Bouillie de pomme de terre : gaz en vingt-quatre heures. En quarante-huit heures, coloration jaune devenant orangée par la suite, mais jamais franchement rouge.

En anaérobiose, avec de la levure pour assurer une meilleure élimination de l'air, le développement est plus abondant.

Tiges de lin stériles en eau distillée : ensemencé avec de la levure, *Cl. haumanni* se développe bien. Dégagement de bulles gazeuses le long de la tige. En trois jours, rouissement complet, les fibres se détachent facilement.

Sucre fermentés : arabinose, xylose, rhamnose ; glucose, lévulose, galactose, mannose ; saccharose, maltose, lactose ; mannitol, salycine, amygdaline.

Ne sont pas fermentés : arabitol, dulcitol, sorbitol, inositol, raffinose, inuline, amidon.

*Sérologie*. — Pas d'antigène commun avec *Amylobacter* et *Cl. felsineum*.

*Cl. haumanni* se différencie de *Cl. felsineum* d'après Soriano :

Par sa morphologie : spore terminale (en réalité subterminale, on note des formes analogues chez *Cl. felsineum*) ;

Par son aspect cultural : pas de *phytogléc* et pigment jaune (*felsineum* orangé).

Par l'absence de pouvoir gélatinolytique.

#### *Clostridium roseum* McCoy et McClung [27] (2).

Origine : souche isolée par Andrewes de maïs allemand à partir d'une culture d'enrichissement sur blé grossièrement moulu en 1930.

(2) Certains caractères non rapportés par McCoy et McClung ont été déterminés grâce à une souche isolée par A.-R. Prévet [27 ter] : souche A. 39 X.

**Isolement sur gélose inclinée nutritive en anaérobiose.** Les petites colonies isolées obtenues après quarante-huit heures repiquées sur farine de blé donnent des cultures roses. Deux souches ont été ainsi isolées (n°s 42 et 43).

**Morphologie.** — Bâtonnet Gram-positif  $3,9 \mu \times 0,8 \mu$ , spores clostridiennes. Les clostridies mesurent  $6,7 \mu \times 1,4 \mu$ . Les spores subterminales sont volumineuses :  $2,7 \mu \times 1,2 \mu$ , et souvent groupées en chapelets de spores libres. Granulations colorables en bleu par l'iode lorsque les germes ont été cultivés sur milieu contenant de l'amidon.

**Physiologie.** — Anaérobiose strict. Température optima, 37°. Pousse de 20° à 40°. Les spores résistent dix minutes à 100° et vingt minutes à 80°. Ne contient pas de catalase.

Gélose inclinée dans le vide : colonies lisses à bords légèrement irréguliers. Au bout de quarante-huit heures, les colonies se colorent en rouge orangé. La pigmentation se produit même en l'absence d'air.

En présence d'air la coloration fonce. Le pigment, rouge pourpre, diffuse dans le milieu à quelques millimètres de la colonie.

**Gélatine : liquefiée.** — Ovalbumine : ramollie, incomplètement digérée.

Pas d' $H_2S$  sur milieu à l'oeuf alcalin, ni sur milieu au cerveau. Pousse sur les milieux à base de viande :

Milieu au cerveau : gaz, développement, pas de noircissement.

Milieu à la viande alcaline de Robertson : développement, gaz.

Bouillon au foie : développement, pas de protéolyse.

Lait coagulé : gaz, puis digestion de la caséine.

Gélose au lait : protéolyse en halo autour des colonies.

Bouillie de blé : gaz, croissance abondante, hydrolyse de l'amidon. Coloration rose, surtout à température inférieure à 37°.

Milieu à la pomme de terre : désintégration complète avec formation d'un liquide jaunâtre. Sédiment bleuâtre. Odeur d'alcool butylique. Amidon complètement utilisé.

**Glucides attaqués.** — Arabinose, xylose ; glucose, mannose, galactose, lévulose ; saccharose, maltose, lactose ; raffinose, salicine, esculine, amygdaline, amidon, dextrine, inuline, pectine, glycogène.

Glucides non attaqués : glycérol, érythritol, mannitol, cellulose.

**Caractères\* biochimiques.** — Pas d' $H_2S$  ni d'indol sur milieux à la viande.

Nitrites réduits en sept jours sans formation de nitrites.

Nitrites réduits en sept jours.

Réduit les thiosulfates et les sulfites en  $H_2S$ .

Sur bouillie de blé à 5 ou 8 p. 100, *Cl. roseum* attaque l'amidon

complètement avec formation de quantités assez fortes de solvants neutres : butanol, éthanol, acétone : pas d'isopropanol.

Sur bouillon VF glucosé, formation d'acides butyrique, lactique et formique, d'acéthyl-méthyl-carbinol (A.-R. Prévot).

Sur milieu peptoné additionné de 5 p. 100 de pectine, McCoy et McClung [27] ont noté la formation de faibles quantités de solvants neutres, le développement étant paresseux.

*Cl. roseum* se distingue de *Cl. felsineum* par la couleur du pigment rose rouge (*felsineum* jaune ou jaune orangé), l'absence de formation d'isopropanol.

Au point de vue sérologique, les trois germes étudiés par McCoy et McClung : *Cl. felsineum*, *Cl. roseum*, *Cl. acetobutylique*, sont distincts les uns des autres, mais possèdent des antigènes communs (*Cf.*, plus haut).

### *Clostridium corallinum* A.-R. Prévot et M. Raynaud [28].

Origine : poussière des rues de Paris. Sols d'Afrique occidentale.

*Morphologie.* — Bâtonnet 3 à 4  $\mu$   $\times$  0,8  $\mu$  de large. Isolé ou en courtes chaînettes. Filaments dans les vieilles cultures. Spores clostridiennes subterminales 2  $\mu$   $\times$  1  $\mu$ , certaines très près de l'extrémité du bâtonnet, donnant un pseudo-aspect plectridial, analogue à celui présenté par *Cl. haumanni*.

Gram-positif. Mobile. Cils péritriches.

*Physiologie.* — Anaérobiose strict. Résiste une minute à 100°. Température optima, 37°. Pousse encore à 18°-20°.

*Caractères culturaux.* — Pousse bien sur les milieux à la viande.

Gélose profonde glucosée (à base de bouillon VF). Colonies ouatées ou arborescentes. Parfois colonies sphériques volumineuses en forme de ballons.

La pigmentation apparaît en trois ou quatre jours et est d'abord strictement limitée aux colonies voisines de la surface.

Les colonies situées au fond du tube restent longtemps incolores et ne se pigmentent qu'au bout de plusieurs semaines, de façon irrégulière. La coloration est rouge corail. Dégagement gazeux modéré. La présence d'air est indispensable pour l'apparition du pigment.

En bouillon VF en tubes scellés dans le vide la pigmentation n'apparaît jamais.

De même sur gélose inclinée dans le vide, les colonies, arrondies, à bords irréguliers, sont incolores. Si on laisse entrer de l'air dans le tube, après que les colonies se soient développées, on voit celles-ci se pigmenter en deux à trois jours.

Ce caractère est particulier à *Cl. corallinum* et le différencie des autres clostridies pectinolytiques pigmentées.

On note souvent l'apparition dans les tubes de gélose profonde, dans la zone aérobiose supérieure, à 4 à 5 mm. de la surface libre, séparées des colonies habituelles (qui apparaissent dans la zone anaérobiose à partir de 8 à 10 mm. de la surface libre), de toutes petites colonies de diamètre faible (1/2 à 1/4 de millimètre), très



Fig. 4. — *Clostridium corallinum*. Formes en bâtonnets de tailles variables. Formes clostridiennes. Nombreuses spores libres.

nombreuses et très pigmentées. Ces colonies repiquées donnent naissance à des colonies ordinaires.

Eau peptonée : trouble léger, développement faible.

Bouillon glucosé : trouble abondant, gaz.

En tube scellé, après vingt-quatre heures, dépôt floconneux non pigmenté.

En tube de Hall, les corps bactériens qui se déposent sont colorés en rouge.

Gélatine liquéfiée en quarante-huit heures.

Lait coagulé en vingt-quatre heures.

Sérum coagulé non attaqué.

Rouge neutre et phénosafranine réduits en vingt-quatre heures.

Safranine non réduite. Pomme de terre stérile et fragments de carotte non désintégrée.

Lin stérile : désintégration rapide des fibres.

Glucides attaqués : arabinose, xylose, glucose, galactose, fructose, saccharose, maltose, lactose, glycérol, dulcitol, manitol, sorbitol, amidon, inuline.

Nitrates non réduits en nitrites.

La pectine de pomme utilisée dans nos premiers essais n'était pas attaquée apparemment : pas d'acidification notable ni de dégagement gazeux. Avec la pectine de citron (California Fruit Growers Exchange) on constate une attaque faible. Nous reviendrons sur ce point plus loin.

Avec certaines souches (variété I, et surtout variété II) presque aucun glucide n'est fermenté.



FIG. 2. — *Clostridium corallinum*. Bâtonnets et formes sporulées. Noter l'existence d'une zone colorée séparant la spore de l'extrémité libre du germe.

*Caractères biochimiques* : Pas d' $H_2S$  ni d'indol. Bouillon VF glucosé : formation d'acides butyrique et acétique, avec traces d'acide formique et d'une faible quantité de butanol, d'éthanol et d'acétone. L'acide lactique est formé par certaines souches et non par d'autres. Absence d'acétyl-méthyl-carbinol.

*C. corallinum* est dépourvu de tout pouvoir pathogène.

#### *Clostridium saturni rubrum* A.-R. Prévot [30].

Origine : Sol de Côte d'Ivoire.

*Morphologie*. — Bâtonnet droit 4 à 5  $\mu$   $\times$  0,8  $\mu$ . Isolé ou en

courtes chaînettes, parfois en longs filaments. Mobile, Gram-positif. Sporulé. Spores clostridiennes subterminales, rares dans les milieux ordinaires.

*Physiologie.* — Anaérobiose strict. Température optima, 26°. Pousse cependant à 37°. Thermo-résistance faible, résiste une heure à 60° et cinq minutes à 70°. Tué à 80°.

*Caractères culturaux.* — Pousse bien sur les milieux à base de viande.

Gélose profonde : colonies très irrégulières à contour ouaté ou en rameaux, se pigmentant rapidement d'abord en jaune puis en rouge saturne. Le maximum de coloration est atteint au troisième jour. Les colonies se pigmentent en même temps sur toute la hauteur du tube. Dégagement abondant de gaz.

A 37° le pigment n'apparaît pas et les souches repiquées à 37° perdent leur pouvoir chromogène.

Eau peptonée : culture grêle, peu de gaz.

Bouillon VF glucosé : trouble rapide et abondant, gaz.

Les germes se déposent ensuite en un culot fortement coloré. Le pigment se forme donc même en l'absence d'air.

Gélatine non liquéfiée.

Lait non coagulé.

Protéines coagulées non attaquées.

Glucides fermentés avec dégagement abondant de gaz : arabinose, glucose, galactose, lévulose, saccharose, maltose, lactose, mannnitol, amidon.

Glucides non fermentés : inuline, sorbitol, glycérine.

*Caractères biochimiques.* — Nitrates non réduits en nitrites.

Pas de SH<sub>2</sub>, ni d'indol, ni d'acétyl-méthyl-carbinol.

Acides volatils formés en bouillon VF glucosé : acides caproïque, valérianique et propionique.

Production d'acide lactique et d'alcools.

Gaz : dégagement très abondant de CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> = 1).

Légèrement pathogène : les cobayes inoculés avec des cultures de vingt-quatre heures meurent sans lésion apparente. Le germe ne produit ni toxine, ni hémolysine.

#### *Clostridium aurantibutyricum* Hellinger [29].

La description est donnée d'après Hellinger [29]. Certains caractères non mentionnés dans la publication précédente ont été recherchés par nous-même avec la souche que M<sup>le</sup> Hellinger a eu l'amabilité de nous envoyer. Nous sommes heureux de la remercier ici.

Origine : Souche isolée par Weizmann en 1939 d'un échantillon de tige d'hibiscus d'Afrique du Sud.

*Morphologie.* — Bâtonnets mobiles ; dimensions variables :

A 30° 2,8  $\mu$   $\times$  0,55 — 0,60  $\mu$  ;

A 37°, 40 — 17  $\mu$   $\times$  0,50 — 0,55  $\mu$ .

Spores apparaissant facilement à 30° sur milieu à 5 p. 100 de maïs : subterminales. Les clostridies mesurent 5,5 à 10,5  $\mu$   $\times$  0,9 — 1  $\mu$ .

Spores subterminales et ovales 1,9 — 2,4  $\mu$   $\times$  0,85 à 1,1  $\mu$ .  
Cils périthriches.

Les formes jeunes sont Gram-positives et la coloration par l'iode révèle des granulations jaunes dans les cellules végétatives jeunes et des granulations bleues dans les clostridies.

*Physiologie.* — Anaérobiose strict. Thermorésistance : deux minutes à 100°. Température optima : 30°. Pousse bien à 37°.

*Caractères culturaux.* — Milieux à la viande : pas de développement.

Pousse bien sur les milieux végétaux : bouillon de pomme de terre, gélose profonde au bouillon de pomme de terre, bouillie de maïs ou de blé, ou de levure glucosée.

Gélose profonde au bouillon de pomme de terre : colonies en forme de lentilles composées.

Gélose inclinée à l'eau de levure, en anaérobiose : colonies plus ou moins irrégulières, de couleur orangé rose.

Gélatine liquéfiée.

Pomme de terre : non désintégrée d'après Hellinger.

Carotte : désintégrée.

Bouillie de maïs à 5 p. 100. Gaz abondant, coloration rose et action diastasique nette mais incomplète. La bouillie n'est pas entièrement solubilisée.

Pigmentation : orangé rose sur gélose à l'eau de levure, parfois rose pâle devenant orangé par maintien prolongé en conditions anaérobies.

La couleur est plus intense au centre de la colonie. Lors du premier isolement, la pigmentation est très marquée. À la suite de nombreux repiquages la coloration devient moins prononcée et n'apparaît plus qu'irrégulièrement, certaines colonies ne se colorant qu'après plusieurs semaines. La souche que nous avons reçue était dans ce cas.

La pigmentation cependant apparaît toujours en bouillie de maïs.

Glucides fermentés avec gaz et acidification :

Arabinose, xylose, glucose, galactose, lévulose, mannose, saccharose, maltose, lactose, amidon, fortement attaqués.

Rhamnose, raffinose, dextrine, moins énergiquement.

Salicine et pectine, faiblement.

Glucides non fermentés : érythritol, sorbitol, mannitol ; glyco-gène ; inuline ; cellulose.

*Caractères biochimiques.* — Nitrates non réduits en nitrites. Formation d'indol et de SH<sub>2</sub>. La fermentation du glucose et du maïs produit de fortes quantités d'acides butyrique et acétique, un peu d'acide formique, d'acide lactique et des quantités relativement faibles de solvants volatils : butanol, éthanol, acétone et isopropanol et de l'acétyl-méthyl-carbinol. Cette répartition quantitative des produits de fermentation le rapprocherait, pour Hellinger, de *Cl. butyricum* Prazmowski, dont il se sépare par la liquéfaction de la gélatine.

La formation, même en faible quantité, de solvants neutres le rapproche de *Cl. acetobutylicum*, comme d'ailleurs, son pouvoir gélatinolytique, mais, conformément aux conclusions de Hellinger,

#### Caractères différentiels des Bactéries anaérobies pectinolytiques.

	<i>Pl. pectinovorum</i>	<i>Cl. prisineum</i>	<i>Cl. haumannii</i>	<i>Cl. roseum</i>	<i>Cl. corallinum</i>	<i>Cl. saturni rubrum</i>	<i>Cl. auranti butyricum</i>
Couleur . . . . .	0	Orangé jaune ou rose.	Jaune canari ou rouge.	Rose.	Rouge corail.	Rouge saturne.	Orangé ou rouge.
Influence de l'air. . . . .	0	0	0	0	+ pas de pigment sans air.	0	0
gmat. . . . .							
latine . . . . .	+	+	0	+	+	0	+
t. . . . .	(lentement.)	+	?	+	+	0	+
ol. . . . .	0	+	?	0	0	0	+
2. . . . .	0	+	?	0	0	0	0
styl-méthyl-carbinol . . . . .	0	+	?	+	0	0	+
de butyrique . . . . .	+	+	?	+	+	0	+
de acétique . . . . .	+	+	?	+	+	0	+
de formique . . . . .	± (traces).	± (traces).	?	+	+	0	+
de lactique . . . . .	+	+	?	+	+	+	± (traces).
tanol . . . . .	+	+	?	+	+	?	+
anol . . . . .	+	+	?	+	+	?	+
éstone . . . . .	+	+	?	+	+	?	+
propanol . . . . .	+	± ou 0	?	0	0	?	± (traces),
mpérature optima . . . . .	37°	37°	37°	37°	37°	26°	30°
jeux à base de viande . . . . .	0 ou +	0	+	+	+	+	0
midon . . . . .	0 ?	0	+	+	+	+	+
line . . . . .	(réserve).						
cérol. . . . .	+	0	?	+	+	0	0
bitol. . . . .	+	0	?	?	+	0	0

la présence de pigment suffit à l'en séparer et légitime son individualisation en espèce autonome.

Les caractères qui le différencient des autres Clostridies pectinolytiques seront rassemblés dans le tableau final.

Nous avons pu rechercher, avec la souche qui nous a été envoyée par M<sup>me</sup> Hellinger, les caractères suivants :

Croissance sur milieu à base de viande : nulle.

Lait : coagulation en douze heures, fermentation énergique, gaz abondant.

Indol : présence.

SH<sub>2</sub> : non décelé.

Gélatine : liquéfiée.

Par ailleurs, *Cl. auranti butyricum* paraît très résistant à l'acidité. Il a donné de bonnes cultures dans un milieu comprenant 1 p. 100 de peptone et 2 p. 100 de pectine, pH non ajusté. Le pH de ce milieu était de 5,0. Aucun des autres germes essayés (*Cl. corallinum*, *Pl. pectinovorum*, *Cl. felsineum*, *Cl. foseum*) n'a donné de culture dans ces conditions.

Au contraire, *Cl. auranti butyricum* s'est développé en donnant une culture abondante. Le pH final était de 3,65.

#### ETUDE DU POUVOIR PECTINOLYTIQUE.

L'étude de l'attaque des pectines par les bactéries en général, et par les bactéries anaérobies en particulier a toujours présenté de nombreuses difficultés. Les pectines commerciales contiennent souvent comme impuretés divers glucides, en particulier des pentoses, et ce fait explique certaines des contradictions anciennes (*Cf.* McCoy et Peterson [32], Weyer et Rettger [40]).

La nature chimique des pectines n'est pas aussi simple que celle des autres polyosides et rapproche ces substances des gommes végétales [41]. Sans entrer dans la discussion détaillée de leur structure, rappelons que d'après Hirst et Jones [41] les pectines sont probablement constituées par des mélanges physiques de polyosides complexes, dont la composition peut présenter certaines variations suivant la plante considérée et même suivant la phase de croissance pour une plante donnée. Cependant on trouve toujours comme élément principal un polygalacturonide associé à un arabane et à un galactane. Pour la majorité des auteurs, le nom de pectine doit être réservé au constituant polygalacturonique [41 bis]. Ce dernier est formé d'unités d'acide *d*.galacturonique associées en liaison 1-4 pour former une longue chaîne, certaines des fonctions acides étant estérifiées par des restes méthyles. Contrairement aux opinions anciennes, les pectines sont des substances de poids moléculaire élevé [41 bis, 42].

A l'état naturel, la pectine peut exister sous forme soluble (jus

de fruit), mais elle se trouve le plus souvent sous une forme insoluble à laquelle on donne le nom de protopectine. L'insolubilité est attribuée soit au fait que la pectine est liée sous forme de sels insolubles (calcium ou magnésium), soit au fait qu'elle est engagée dans une combinaison de nature mal définie avec la cellulose.

La pectine du lin a été étudiée récemment par Lüdke et Felser [43].

Les anaérobies pectinolytiques se définissent historiquement comme les germes assurant le rouissement des plantes textiles ou, d'une façon plus générale, la macération des végétaux. Pour préciser les mécanismes enzymatiques qu'ils mettent en œuvre pour assurer la dissociation du « ciment intercellulaire », on devrait étudier leur action sur les différents constituants des pectines, si l'on admet la conception de Hirst et Jones. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux portant sur l'action de ces germes sur les arabanes et les galactanes. La recherche des enzymes correspondants, arabanase et galactanase, reste donc à faire.

Les études bactériologiques ont été faites en général sur des pectines commerciales plus ou moins purifiées auxquelles on attribue une structure de polygalacturonide partiellement méthylé.

On admet en conséquence qu'il existe trois types d'enzymes pouvant agir sur ces substances pectiques [44, 45, 45 bis] :

- 1° la protopectinase ;
- 2° la polygalacturonidase ;
- 3° la pectine-estérase.

1° La protopectinase transformerait la protopectine insoluble en pectine soluble. La nature de la liaison éventuelle entre pectine et cellulose étant inconnue, le mécanisme chimique de cette action enzymatique éventuelle est mal défini. On admet que c'est cet enzyme qui dissout la lamelle moyenne au cours de la macération des végétaux. On a rapporté sa présence chez de nombreux micro-organismes aérobies : *Erwinia carotovora*, *Penicillium ehrlichi*, *Botritis cinerea*, etc. D'après Boeck [46], il n'y aurait pas lieu de distinguer un enzyme spécial appelé protopectinase parce que celle-ci se trouve toujours dans des organismes qui possèdent aussi la polygalacturonidase et la pectine-estérase.

Les méthodes de recherche de l'activité dite protopectinasique, malgré des essais de détermination quantitative, sont en général simplement qualitatives. On étudie l'action désintégrante sur des fragments de tissus végétaux (pomme de terre, carotte, etc.). Ces méthodes sont facilement transposables en tests bactériologiques, après stérilisation des échantillons. La recherche du pouvoir rouissant vis-à-vis de fragments de textiles préalablement stérilisés peut être considérée comme une variante particulière de ces techniques.

2<sup>e</sup> La polygalacturonidase hydrolyse la chaîne principale des pectines en donnant de l'acide galacturonique libre. Les premiers stades de la scission de la molécule de polyuronide peuvent être suivis par des mesures physiques, l'enzyme provoquant une baisse rapide de la viscosité des solutions de pectine.

La mesure chimique de l'activité polyuronidasique se fait habituellement en dosant la pectine résiduelle et l'acide galacturonique formé. La pectine est dosée facilement par la méthode au pectate de calcium. L'acide galacturonique se détermine le plus souvent par son pouvoir réducteur. La baisse de viscosité n'évolue pas toujours parallèlement à l'augmentation du pouvoir réducteur et à la diminution du taux des pectates. Au début de l'action enzymatique on observe souvent une baisse rapide de viscosité alors que le taux de pectate de calcium diminue beaucoup plus lentement [47]. D'après Janssen et McDonnell [47 bis], la polygalacturonidase n'agirait qu'après déméthylation préalable de la pectine. Lors de la dégradation thermique des pectines, la baisse de viscosité que l'on observe, et qui est liée, elle aussi, à une dépolymérisation, se produit de même sans qu'apparaissent de changements appréciables du pouvoir réducteur. Kertesz [48], Merrill et Wecks [49].

La mesure de la chute de viscosité des solutions de pectine sous l'influence de l'enzyme constitue donc une méthode très sensible de l'activité polygalacturonidasique, car elle permet de déceler des transformations qui pourraient éventuellement n'être pas reconnues par des dosages chimiques.

Lorsqu'on veut opérer dans des conditions stériles, on rencontre de grandes difficultés. La pectine très polymérisée nécessaire pour effectuer des mesures de variations de viscosité est en effet très sensible à l'action de la chaleur [48, 49] et le chauffage à l'autoclave ou même à 100° réalise un clivage hydrolytique considérable de la molécule.

Nous n'avons pas pu obtenir de solutions stériles de pectines non dégradées en utilisant la stérilisation par la chaleur.

La haute viscosité des solutions de pectine ne permet pas non plus de les stériliser facilement par filtration. Werch, Jung, Day, Friedmann et Yvy [50] indiquent une technique de préparation des bougies qui leur a permis de réaliser la filtration de solutions à 1 p. 100 de pectine de citron. Nous n'avons pu effectuer personnellement cette filtration et nous supposons que cette divergence de résultats est due à des différences dans la nature et la porosité des bougies employées (nos bougies étaient des bougies Chamberland L3).

Pour rechercher cette activité avec les anaérobies pectinolytiques nous avons utilisé la technique des *resting bacteria* permettant de travailler comme dans le cas de la recherche des polyga-

lacturonidases ordinaires, avec une solution de pectine non stérilisée.

Nous donnerons plus loin les détails techniques et les résultats.

3° La pectine-estérase (ou pectine méthoxylase) réalise la déméthylation de la pectine. Cet enzyme est en général considéré comme une estérase non spécifique. L'acide pectique résultant de cette déméthylation donne un gel en présence de calcium. La pectine-estérase est donc l'enzyme responsable de la gélification des solutions de pectine. On mesure son activité soit directement (par la détermination des groupes méthoxyles libérés), soit indirectement (par la mesure de l'activité gélifiante).

4° Il resterait enfin à étudier l'enzyme ou, plus vraisemblablement l'ensemble complexe d'enzymes qui permet au germe d'utiliser éventuellement l'acide galacturonique formé après hydrolyse de la molécule de pectine. On peut rechercher le pouvoir fermentaire des bactéries vis-à-vis d'acide galacturonique neutralisé, soit en mesurant l'acide galacturonique disparu, soit en recherchant les signes qualitatifs de cette attaque (dégagement de gaz, acidification, croissance).

Si l'on ne se préoccupe pas d'étudier l'action des germes sur une pectine très polymérisée, on peut faire un milieu nutritif contenant de la pectine (1 à 2 p. 100), que l'on stérilise par la chaleur. On détermine après culture le taux de pectine résiduelle, le pH, l'acidité titrable, l'acidité volatile et éventuellement, comme l'ont fait Potter et McCoy [33], l'indice de saponification (groupes méthoxyles), l'acide galacturonique libre et l'acide galacturonique total.

1° RECHERCHE QUALITATIVE DE L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE. — Les tests employés, considérés parfois comme tests de la protopectinase, consistent dans la recherche de l'action désintégrante des germes sur des fragments de tissus stérilisés.

En ce qui concerne les fragments de pomme de terre, de carotte ou de tissus analogues, il est facile de les stériliser sans les altérer profondément, en employant la technique habituelle de préparation des « tranches » de pomme de terre.

Pour les plantes textiles, pour le lin en particulier, la stérilisation présente au contraire des difficultés sérieuses : si les fragments de lin sont immergés complètement dans de l'eau ou dans un bouillon nutritif, la stérilisation à 110° pendant trente minutes (indispensable à cause de la présence quasi-constante de germes sporulés pectinolytiques sur ces tiges) provoque une attaque profonde.

La stérilisation à sec à 110° préconisée par Tanner [52] est inefficace. Il existe par ailleurs des variations dans la sensibilité à la chaleur. Certaines tiges de lin partiellement lignifiées que

nous avons utilisées ont résisté au chauffage à l'autoclave. Avec la plupart des échantillons que nous avons pu nous procurer cependant, la stérilisation à l'autoclave en milieu liquide provoquait une altération qui rendait difficile la mise en évidence d'une activité propre des germes, la différence entre tiges témoins et tiges soumises à l'action bactérienne étant difficile à préciser.

La technique préconisée par Ruschmann et Bartram [23 bis] permet de surmonter ces difficultés. Les fragments de tige sont stérilisés dans des tubes ne contenant qu'une faible quantité de liquide et on ajoute ensuite stérilement le milieu nutritif ou de l'eau. Ruschmann et Bartram stérilisent par quatre chauffages successifs à 100° à vingt-quatre heures d'intervalle.

Nous avons employé la technique suivante : on place dans de très grands tubes (22 × 400 mm., tubes à bougies) de longs fragments de tiges de lin de 30 cm. On utilise la base et la partie moyenne. On ajoute dans le fond du tube 5 cm<sup>3</sup> environ d'eau peptonée à 10 p. 100 ajustée à pH = 7, et on stérilise à 110° trente minutes. On ajoute stérilement une quantité d'eau stérile telle que la surface libre du milieu soit à 15 cm. environ du fond du tube. Il reste un fragment de tige de 15 cm. qui n'est pas immergé. On place à l'étuve à 37° pour éprouver la stérilité. On ensemence ensuite avec les germes étudiés, l'anaérobiose étant assurée par addition d'un réducteur (réductose, thioglycollate de soude). La partie de la tige non immergée n'est pas soumise à l'action des germes et sert de témoin pour la partie immergée.

#### Résultats des tests qualitatifs de pectinolyse.

GERMES	FRAGMENTS de pomme de terre	FRAGMENTS de carotte	TIGES de lin	RÉFÉRENCES
<i>Pl. pectinovorum</i> . . . . .	+	0	+	23-23 bis. 43 24
<i>Cl. felsineum</i> . . . . .	+	+	+	23-23 bis. 24-24 bis. 24 ter.
<i>Cl. haumannii</i> . . . . .	?	?	+	26
<i>Cl. roseum</i> . . . . .	?	?	?	27
<i>Cl. corallinum</i> . . . . .	0	?	+	39
<i>Cl. saturni rubrum</i> . . . . .	?	?	+	30
<i>Cl. auranti-butyricum</i> . .	0	+	+	29

Nous avons effectué ces tests qualitatifs avec les diverses souches de pectinolytiques dont nous disposions.

1<sup>o</sup> *Fragment de pomme de terre*. -- Aucune de nos souches n'a provoqué, de façon régulière, la désintégration de fragments de pomme de terre.

2° *Fragments de carotte*. — Seul *Cl. auranti-butyricum* a provoqué la désintégration du tissu en quelques jours.

3° *Tiges de lin stériles* :

<i>Cl. sporogenes</i> . . . . .	Aucune action en six jours.
<i>Pl. pectinovorum</i> N° 3.723. . . . .	Fibres partiellement dissociées en 6 jours.
<i>Pl. pectinovorum</i> (P.J.) . . . . .	Fibres partiellement dissociées en 6 jours.
<i>Cl. felsineum</i> (N CTC 3.220) . . . . .	Fibres partiellement dissociées en 6 jours.
<i>Cl. roseum</i> (A 39 x) . . . . .	Fibres complètement dissociées en 6 jours.
<i>Cl. corallinum</i> . . . . .	Fibres complètement dissociées en 6 jours.
<i>Cl. saturni rubrun</i> . . . . .	Fibres partiellement dissociées en 6 jours.
<i>Cl. auranti butyricum</i> . . . . .	Fibres complètement dissociées en 6 jours.

On voit que les méthodes qualitatives fournissent des résultats divergents. Le rouissage du lin semble plus facile à réaliser que la désintégration de tissus, comme la pomme de terre ou la carotte. Malgré les précautions prises pour donner à la recherche du rouissage du lin en tubes un caractère objectif, l'interprétation des résultats reste entachée d'un coefficient personnel, surtout lorsque la désintégration des fibres n'est que partielle.

L'attaque des substances pectiques au cours du rouissage peut être précisée par l'examen histologique des tiges après action des germes.

Le procédé, assez long à mettre en œuvre, a été utilisé avec succès pour la première fois par Omelianski en 1904 qui a publié d'excellentes microphotographies [13 bis].

La relation entre le rouissage et l'attaque des pectines semble établie d'après les résultats de la littérature que nous avons discutés au premier chapitre.

Lüdkte et Felser [21 ter] ont affirmé qu'au cours du rouissage spontané du lin, on observait la disparition complète de la pectine A (extractible par l'oxalate d'ammonium) sans qu'il apparaisse de pectine soluble dans le milieu. La pectine B, plus intimement liée à la fibre et non directement extractible par l'oxalate d'ammonium, ne serait pas détruite et persisterait après rouissage.

Enebo et alt. [53] ont montré cependant que la pectine B diminuait aussi au cours du rouissage spontané. Il apparaît dans le liquide des acides volatils : acide acétique (61 p. 100), butyrique (32 p. 100), propionique (6 à 7 p. 100) et de faibles quantités d'acide valérianique et formique.

Ces mêmes auteurs ont établi de plus que *Pl. pectinovorum* (*Granulobacter pectinovorum*) et *Cl. felsineum* attaquent en culture pure la pectine A extraite des tiges de lin. Dans un milieu nutritif contenant 2 p. 100 de pectine de lin (et 1 p. 100 de cellulose servant de support) et inoculé avec *Pl. pectinovorum* ou *Cl. felsineum*, ils ont constaté que toute la pectine disparaît en cinq jours. Les acides volatils fournis ne sont pas exactement les mêmes que dans le cas du rouissage spontané.

	<i>Pl. pectinovorum</i>	<i>Cl. felsineum</i>
Acide formique . . . . .	0,4	0,0
Acide acétique . . . . .	24,2	33,8
Acide butyrique. . . . .	7,2	7,4
Total . . . . .	31,8	41,8

Les chiffres expriment le nombre de grammes d'acide formés pour 100 g. de pectine fermentés (Enebo et alt. [53]).

2<sup>o</sup> RECHERCHE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITÉ PECTINOLYTIQUE. — Nous n'avons trouvé dans la littérature d'autres indications sur la recherche quantitative de l'activité pectinolytique des anaérobies que celles fournies par Potter et McCoy [33] sur *Cl. felsineum* et par Enebo, Carlson et Lundin [53] sur *Pl. pectinovorum* et *Cl. felsineum*.

Nous avons donc été amené à rechercher de façon comparative l'activité pectinolytique des souches dont nous disposions. Les résultats sont extraits d'un travail effectué en collaboration avec Brugières et R. Saissac [54].

1<sup>o</sup> *Recherches en culture*. — Nous avons cultivé les germes sur milieu à 1 p. 100 de peptone et 1 p. 100 de pectine et nous avons déterminé l'acidité fixe, l'acidité volatile totale et la pectine résiduelle. Cette dernière a été dosée par la méthode au pectate de calcium suivant la technique de Hinton [55]. La pectine employée était la pectine de citron de la California Growers Exchange (Pectine N. F. VII), dépourvue de pentose et de pentosane et sans pigment.

On voit d'après les tableaux que la mesure de l'acidité totale et celle de l'acidité volatile totale ne constituent pas un bon indice de l'attaque des pectines sur un milieu complexe, car elles peuvent être élevées sans que cette attaque soit importante. Ceci est particulièrement manifeste dans le cas de *Cl. sporogenes*, choisi à dessein, car il est capable de donner des acides volatils à partir des amino-acides du bouillon ou de la peptone [56].

Il peut en être de même pour certains anaérobies pectinolytiques et nous pensons en conséquence que les activités pectinolytiques attribuées à des germes sur la base de ces tests (augmentation de l'acidité totale et de l'acidité volatile totale après culture dans un milieu pectiné) ne peuvent être tenues pour démontrées. La diminution du taux des pectates permet de reconnaître les intensités très différentes de l'activité pectinolytique des souches essayées :

- Cl. aurantibutyricum* est très énergiquement pectinolytique ;
- Cl. sporogenes*, *Cl. saccharobutyricum* GR 4, ne manifestent aucune activité ;
- Les autres germes montrent une activité faible et variable.

## Résultats.

	1	2	3	4	5
--	---	---	---	---	---

## Expérience 1 :

Témoin non ensemencé . . . . .	2,3	0,1	80	0	
<i>Cl. sporogenes</i> (G01) . . . . .	3,0	1,7	80,5	0	
<i>Pl. pectinovorum</i> (NCTC 3723) . . . . .	3,6	0,4	69	20,8	
<i>Pl. pectinovorum</i> (P.J.) . . . . .	3,5	0,4	60	24,6	
<i>Cl. corallinum</i> (T.R.) . . . . .	4,0	3,1	68	45	
<i>Cl. aurantibutyricum</i> . . . . .	6,4	2,1	0	100	
<i>Cl. roseum</i> (A 39 X) . . . . .	3,7	2,9	69	13	
<i>Cl. felsineum</i> (NCTC 3220) . . . . .	4,0	0,65	77	3	

## Expérience 2 (37°) :

Témoin . . . . .	1,17	0,25	87	0	6,85
<i>Cl. sporogenes</i> . . . . .	1,20	0,85	86	0	6,75
<i>Pl. pectinovorum</i> (3723) . . . . .	1,37	0,40	82	6,5	5,40
<i>Pl. pectinovorum</i> (P.J.) . . . . .	1,33	0,40	85	2	6,25
<i>Cl. corallinum</i> (T.R.) . . . . .	1,30	2,40	81	7,2	6,30
<i>Cl. aurantibutyricum</i> . . . . .	2,66	3,20	0	100	4,25
<i>Cl. roseum</i> (A 39 X) . . . . .	1,43	0,40	75	13,8	5,25
<i>Cl. felsineum</i> (3220) . . . . .	1,43	0,50	69	21	5,75
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (ATC 860) . . . . .	1,47	0,40	79	9,2	5,40
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (GR 4) . . . . .	1,40	0,60	87	0	6,0
<i>Cl. saturni rubrum</i> . . . . .	1,40	0,30	79	9,2	5,80

## Expérience 3 (26°) :

Témoin . . . . .	1,17	0,25	87	0	6,85
<i>Cl. sporogenes</i> . . . . .	1,37	1,55	86	0	6,3
<i>Pl. pectinovorum</i> (3723) . . . . .	1,40	0,40	53	39	6,4
<i>Pl. pectinovorum</i> (P.J.) . . . . .	1,53	0,40	86	0	6,25
<i>Cl. corallinum</i> (T.R.) . . . . .	1,57	0,30	86	0	6,6
<i>Cl. aurantibutyricum</i> . . . . .	2,13	2,30	48	44,8	4,5
<i>Cl. roseum</i> . . . . .	1,37	0,40	87	0	6,45
<i>Cl. felsineum</i> . . . . .	1,50	0,40	87	0	6,45
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (ATC 860) . . . . .	1,53	0,25	87	0	5,4
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (GR 4) . . . . .	1,77	0,35	87	0	6,1
<i>Cl. saturni rubrum</i> . . . . .	1,43	0,35	87	0	6,4

## Expérience 4 (37°) :

Milieu : pectine, 1 p. 400; peptone, 1 p. 100 (2 g. de papier filtre découpés en petits fragments pour servir de support aux bactéries dans 200 cm<sup>3</sup> de milieu).

Témoin . . . . .	1,4	0,16	96	0	5,9
<i>Pl. pectinovorum</i> (P.J.) . . . . .	1,9	0,47	84	12,4	5,3
<i>Cl. saccharobutyricum</i> (860) . . . . .	4,3	2,20	35	63	4,3

## Expérience 5 (26°) :

<i>Cl. pectinovorum</i> (3723) . . . . .	1,8	0,48	84	12,4	5,4
--	-----	------	----	------	-----

Colonne 1 : Acidité totale (centimètres cubes d'acide N/10 dans 10 cm<sup>3</sup> de milieu).

Colonne 2 : Acidité volatile totale (centimètres cubes d'acide N/10 pour 10 cm<sup>3</sup> de milieu).

Colonne 3 : Pectines résiduelles. Poids en milligrammes pour 10 cm<sup>3</sup> de milieu (les dosages ont été faits sur 30 cm<sup>3</sup> de milieu).

Colonne 4 : Pourcentage de pectine attaquée.

Colonne 5 : pH final.

mais certaine. Ce groupe comprend tous les germes trouvés actifs dans le rouissement et la souche de *Cl. saccharobutyricum* 860. L'activité pectinolytique de ce germe, déjà notée par Sjolander et McCoy [20], montre qu'il existe en dehors des deux groupes que nous avons étudiés : *Pl. pectinovorum* et clostridies pigmentées, d'autres germes anaérobies doués de propriétés pectinolytiques :

2° *Expériences avec des suspensions bactériennes.* — Nous avons employé des suspensions bactériennes très denses obtenues par culture de vingt-quatre heures sur bouillon de pomme de terre. Les germes provenant de 1 l. de culture sont centrifugés et repris dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée débarrassée d'air par ébullition préalable. (La densité bactérienne est d'environ 8 mg d'N bactérien par centimètre cube.) La suspension obtenue est versée dans une fiole contenant 50 cm<sup>3</sup> de solution de pectine à 2 p. 100 ajustée à pH = 7 ou à 1 p. 100 et ajustée à pH = 6,0. Les fioles sont agitées dans l'appareil de Warburg à 37°.

Après quatre ou six heures d'agitation on centrifuge et on mesure la viscosité au viscosimètre d'Ostwald.

Témoin : 50 cm<sup>3</sup> de solution de pectine + 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée.

Avec *Cl. felsineum*, *Cl. roseum*, *Cl. corallinum*, *Pl. pectinovorum* P. J., *Pl. pectinovorum* n° 3723, *Cl. sporogenes*, *Cl. saccharobutyricum* GR 4 et 860 on n'observe aucune baisse de viscosité, soit avec la pectine à 2 p. 100 pH = 7, soit avec la pectine à 1 p. 100 pH = 6.

Avec *Cl. auranti-butyricum*, par contre, on note une chute considérable de viscosité.

	TEMPS d'écoulement en secondes dans le viscosimètre d'Ostwald
Solution de pectine témoin à 2 p. 100 pH : 7 . . . . .	293
Solution de pectine agitée avec la suspension de <i>Cl. auranti-butyricum</i> pendant 6 heures. . . . .	5
Eau distillée . . . . .	4,30
Solution de pectine à 1 p. 100 pH : 6 (témoin) . . . . .	38
Solution de pectine à 1 p. 100 agitée pendant 4 heures avec la suspension de <i>Cl. auranti-butyricum</i> . . . . .	21

3° RECHERCHES DE L'ACTIVITÉ FERMENTAIRE VIS-A-VIS DE GALACTURONATE DE SODIUM. — La recherche s'effectue dans le milieu suivant :

Eau peptonée à 2 p. 100. . . . .	1 vol.
Solution de galacturonate de sodium à 2 p. 100 . . . . .	1 vol.

L'eau peptonée ajustée à pH = 7 est stérilisée à l'autoclave. La solution de galacturonate est obtenue en neutralisant une

solution à 2 p. 100 d'acide galacturonique (pH = 7). Elle est stérilisée par filtration.

On ajoute stérilement la solution de galacturonate à l'eau péptonée. On répartit en tubes stériles à raison de 5 cm<sup>3</sup> par tube et on ajoute 1 goutte d'extrait de levure concentré. On vérifie la stérilité et on ensemence.

Après deux jours de culture à 37° on mesure le pH et on dose l'acide galacturonique résiduel grâce à son pouvoir réducteur par la microméthode de Somogyi [57].

Chaque tube contient 5 cm<sup>3</sup> de milieu et 28 mg. d'acide galacturonique.

On constate les résultats suivants :

**Fermentation du galacturonate de sodium.**

	(1)	(2)
<i>Cl. aurantibutyricum</i> . . . . .	100	4,8
<i>Cl. saturnirubrum</i> . . . . .	4	5,5
<i>Cl. corallinum</i> . . . . .	0	6,45
<i>Cl. roseum</i> . . . . .	0	6,40
<i>Cl. felsineum</i> . . . . .	0	6,60
<i>Pl. pectinovorum</i> 3723 . . . . .	100	4,90
<i>Pl. pectinovorum</i> P.J. . . . .	100	4,70
<i>Cl. saccharobutyricum</i> 860 . . . . .	100	4,70
<i>Cl. saccharobutyricum</i> GR 4 . . . . .	54	5,50
<i>Cl. sporogenes</i> . . . . .	0	6,40

Colonne (1) : Pourcentage d'acide galacturonique fermenté.

Colonne (2) : pH final.

1<sup>o</sup> Certains germes attaquent énergiquement le galacturonate :

*Cl. aurantibutyricum*, *Pl. pectinovorum* (souches 3723 et P.J.).

*Cl. saccharobutyricum* (souche 860). La souche GR 4 attaque moins énergiquement, mais sans doute possible.

2<sup>o</sup> D'autres germes sont sans action sur le galacturonate :

*Cl. corallinum*, *Cl. roseum*, *Cl. felsineum*, *Cl. sporogenes*.

3<sup>o</sup> Pour *Cl. saturni rubrum* on note une très faible diminution de pouvoir réducteur du milieu associé à un abaissement notable du pH. Le résultat est donc douteux.

On peut constater par cette étude expérimentale que dans le cas de *Cl. aurantibutyricum* tous les tests bactériologiques préconisés pour l'étude de la pectinolyse fournissent des résultats concordants.

Pour les autres germes, par contre, nous avons obtenu des résultats discordants. Si tous ont été capables d'assurer le rouissage de fragments de tige de lin stérilisés, ils n'ont, par contre, attaqué la pectine de citron que de façon faible et irrégulière. Pour tous ces germes, certaines des souches utilisées étaient de vieilles souches de collection ayant subi de nombreux repiquages.

Il est possible que cette particularité explique leur faible activité pectinolytique. Il y a certainement intérêt à rechercher cette dernière au moment même de l'isolement des bactéries à partir de leur milieu naturel.

#### CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> On connaît deux groupes bien étudiés de bactéries anaérobies pectinolytiques :

a) *Plectridium pectinovorum*.

b) Les clostridies pigmentées suivantes :

*Clostridium felsineum*.

*Clostridium haumanni*.

*Clostridium roseum*.

*Clostridium corallinum*.

*Clostridium saturnirubrum*.

*Clostridium aurantibutyricum*.

Il existe probablement dans la nature d'autres types de bactéries anaérobies pectinolytiques. Ces dernières ne constituent donc pas un ensemble naturel parfaitement homogène. La plupart appartiennent cependant au grand groupe des bactéries butyriques anaérobies.

2<sup>o</sup> Ces bactéries sont les agents du rouissage des plantes textiles et, d'une façon plus générale, de la macération des végétaux. Le rôle de chacune des espèces précédemment citées dans ces processus naturels reste à préciser.

3<sup>o</sup> En raison de la multiplicité des espèces de clostridies pigmentées pectinolytiques connues, il convient d'effectuer une étude bactériologique détaillée des souches que l'on isole, si l'on veut en effectuer le diagnostic précis.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEHRENS (J.). *Zentralbl. Bakt.* II, 1902, **8**, 8, 114, 131, 161, 202, 231, 264, 295.
- [2] *Mitteil. d. Gesellsch. f. Beförder. d. Flachs u. Hanfbaues in Preussen*, Lief. II, Berlin, 1852, 120 [cité d'après Behrens (1)].
- [3] HODGES. *Dingler J.*, 1856, 142, 806 [cité d'après Behrens (1)].
- [4] TRÉCUL. *C. R. Acad. Sci.*, 1865, **61**, 156.
- [5] TRÉCUL. *C. R. Acad. Sci.*, 1865, **61**, 432.
- [6] NYLANDER. *Ann. Nat. Bot.*, 1867, série VII, **7**, 214 et 219.
- [7] TRÉCUL. *C. R. Acad. Sci.*, 1867, **65**, 513.
- [8] VAN TIEGHEM. *Bull. Soc. Bot. France*, 1877, **24**, 128 ; 1879, **26**, 25 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1879, **88**, 205.
- [8 bis] OMELIAŃSKI. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, **121**, 653.
- [9] VAN TIEGHEM. *C. R. Acad. Sci.*, 1879, **89**, 5.
- [10] PRAZMOWSKI. *Botan. Ztg.*, 1879, 414.
- [11] KOLB. *C. R. Acad. Sci.*, 1868, **66**, 1024.

- [11 bis] FRÉMY. *J. Pharm. Chim.*, 1840, **26**, 368.
- [12] MANGIN. *C. R. Acad. Sci.*, 1888, **107**, 146.
- [13] FRIBES. *C. R. Acad. Sci.*, 1895, **121**, 742.
- [13 bis] OMELIAŃSKI. *Zentralbl. Bakt. II*, 1904, **12**, 33.
- [14] BEIJERINCK et VAN DELDEN. *Arch. Neerl. Sci. ex. et nat.*, 2<sup>e</sup> série, 1904, **9**, 418.
- [15] DONKER. *Thèse* Delft, 1927.
- [16] WEIZMANN et HELLINGER. *Palestine J. Bot.*, 1944, **4**, 51.
- [16 bis] PRÉVOT. *Manuel de Classification des bactéries anaérobies*, 2<sup>e</sup> édit., Paris, 1948.
- [17] BREDEMANN. *Zentralbl. Bakt. II*, 1909, **23**, 385.
- [18] STOERMER. *Zentralbl. Bakt. II*, 1904, **13**, 35, 171, 306.
- [19] RUSCHMANN et BAVENDAMM. *Zentralbl. Bakt. II*, 1925, **64**, 340.
- [19 bis] RUSCHMANN et BAVENDAMM. *Zentralbl. Bakt. II*, 1925, **65**, 43.
- [20] SJOLANDER et MCCOY. *Zentralbl. Bakt. II*, 1937, **97**, 314.
- [21] WEIZMANN et HELLINGER. *J. Bact.*, 1940, **40**, 665.
- [21 bis] LÜDKTE. *Biochem. Zeitschr.*, 1940, **304**, 56.
- [21 ter] LÜDKTE et FELSER. *Die Bastfaser.*, 1941, **1**, 141.
- [22] CARBONE. *Ann. Igiene sperim.*, 1916, **26**, 1, 57.
- [22 bis] CARBONE et TOMBOLATO. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, 1917, **50**, 563.
- [22 ter] CARBONE. *Staz. Sper. Agr. Ital.*, 1917, **50**, 261 ; 1918, **51**, 355 ; *La macerazione industr. d. Piante tessili col « B. felsineus »*, Milan, 1920 ; *Faserforsch.*, 1922, **2**, 170 ; *Boll. Soc. Intern. Microbiol.*, 1933, **5**, 275 ; *Riv. Biol.*, 1919, **1**.
- [23] RUSCHMANN et BARTRAM. *Zentralbl. Bakt. II*, 1942-1943, **105**, 326.
- [23 bis] RUSCHMANN et BARTRAM. *Zentralbl. Bakt. II*, 1942-1943, **105**, 433.
- [23 ter] McCCLUNG. *Indiana Acad. Sci. Pro.*, 1942, **51**, 71 (réf. in *Biol. Abstr.*, 1943, **17** (1), 5338).
- [24] SORDELLI et SORIANO. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1515.
- [24 bis] SORDELLI et SORIANO. *Rev. Inst. Biol. (Buenos-Aires)*, 1930, **5**, 725.
- [24 ter] SORDELLI et SORIANO. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, 1928, **4**, 611.
- [25] WOLFSOM. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1939, **8**, 643 (réf. in *Zentralbl. Bakt. II*, 1941, **104**, 27). — MĀRKOWA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 824 [réf. in *Chem. Centralbl.*, 1941, **112** (1), 2849]. — BYTSCHKOWSKAYA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 834 [réf. in *Chem. Centralbl.*, 1941, **112** (1), 2849]. — BYTSCHKOWSKAYA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 662 [réf. in *Chem. Centralbl.*, 1941, **112** (1), 1683]. — WOLFSOM et MURATOWA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 672 (réf. in *Zentralbl. Bakt. II*, 1941, **104**, 133). — BYTSCHKOWSKAYA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 570 (réf. in *Zentralbl. Bakt. II*, 1941, **104**, 378). — BYTSCHKOWSKAYA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1942, **11**, 73 (réf. in *Chem. Abstr.*, 1944, **38**, 3134).
- [25 bis] MĀRKOWA. *Microb. (U. R. S. S.)*, 1940, **9**, 464 (réf. *Zentralbl. Bakt. II*, 1941, **104**, 133).
- [26] SORIANO. *Rev. del. Inst. Bact. (Buenos-Aires)*, 1930, **5**, 741.
- [27] MCCOY et McCCLUNG. *Arch. Microbiol.*, 1935, **6**, 230.
- [27 bis] McCCLUNG et MCCOY. *Arch. Microbiol.*, 1935, **6**, 239.
- [27 ter] PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 157.
- [28] PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 182.
- [29] HELLINGER. *J. gen. Microb.*, 1947, **1**, 203.

[30] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **223**, 1035.

[30 bis] McCUNG. *J. Bact.*, 1942, **43**, 35.

[30 ter] McCUNG. *J. Bact.*, 1943, **46**, 507.

[31] MCCOY, FRED, PETERSON, HASTING. *J. Infect. Dis.*, 1930, **46**, 118.

[32] MCCOY et PETERSON. *J. Infect. Dis.*, 1926, **43**, 475.

[33] POTTER et MCCOY. *J. Bact.*, 1947, **54**, 36.

[34] ORLA-JENSEN (Anna D.) et KLUYVER. *Zentralbl. Bakt. II*, 1939-1940, **101**, 257.

[35] LAMPEN et PETERSON. *Arch. Biochem.*, 1943, **2**, 443.

[36] VAN DER LEK. *Thèse* Delft, 1930.

[37] PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *Ces Annales*, 1944, **70**, 185.

[38] PRÉVOT (A.-R.), COHEN (G. N.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 351.

[39] PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 26 juin 1946.

[40] WEYER et RETTGER. *J. Bact.*, 1927, **14**, 399.

[41] BÖCK. *Polyuroniden* (in Bämann et Myrbäck : *Die Methoden der Fermentforschung*, 1941, 239). — HIRST. *J. Chem. Soc.*, 1939, **70**. — HIRST et JONES. *Advanc. in Carbohydr. Chem.*, 1946, **2**, 235. — ANDERSON et SANDS. *Advanc. in Carbohydr. Chem.*, 1945, **4**, 329.

[41 bis] PALLMAN et DEUEL. *Chimia*, 1947, **1**, 27.

[42] SAVERBORN. — *A contribution to the knowledge of the acid polyuronides*, 1 vol. Upsala, 1945.

[43] LÜDKTE et FELSER. *Liebig's Annal. Chemie*, 1941, **549**, 1 ; *Cellulose Chemie*, 1943, **24**, 86. — FELSER. *Bastfaser*, 1941, **1**, 148.

[44] KERTESZ. *Ergebn. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 233.

[45] BÖCK. *Polyuronidasen* (in Bämann et Myrbäck. *Methoden der Fermentforsch.*, 1941, 1914).

[45 bis] TAUBER. *Enzyme Technology*, 1946, 1 vol., 205.

[46] BÖCK. *Chem. Ztg.*, 1941, **65**, 461.

[47] MEHLITZ. *Filtration-enzyme* (in Bämann et Myrbäck : *Die Methoden der Fermentforsch.*, 1941, 2865).

[47 bis] JANSEN et MAC DONNELL. *Arch. Biochem.*, 1945, **8**, 97. — JANSEN, MAC DONNELL et JANG. *Arch. Biochem.*, 1945, **8**, 113.

[48] KERTESZ. *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 254.

[49] MERRILL et WEKS. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, **67**, 2244.

[50] WERCH, JUNG, DAY, FRIEDMANN et YVY. *J. Infect. Dis.*, 1942, **70**, 231.

[51] HAUMANN. *Ces Annales*, 1902, **16**, 380.

[52] TANNER. *Bot. Gaz.*, 1922, **74**, 174.

[53] ENEBO, CARLSON et LUNDIN. *Arch. Bioch.*, 1947, **12**, 339.

[54] RAYNAUD, BRUGIÈRES et SAISSAC. *Activité pectinolytique de quelques germes anaérobies* (à paraître).

[55] HINTON. *Depart. Sci. Ind. Res. Food Invest. Special Rep.* n° 48, 1939.

[56] COHEN-BAZIRE, COHEN et PRÉVOT. *Ces Annales*, 1948, **75**, 291. — SAISSAC, RAYNAUD et COHEN. *Ces Annales*, 1948, **75**, 305.

[57] SOMOGYI. *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 61.

# NATURE ET MODE DE FORMATION DES ACIDES VOLATILS TROUVÉS DANS LES CULTURES DE BACTÉRIES ANAÉROBIES STRICTES

par GEORGES N. COHEN.

(Institut Pasteur, Annexe de Garches, France.  
Laboratoire de Chimie bactérienne du Service des Anaérobies.)

Dans un travail de 1942, Prévot et Taffanel [1] (\*), étudiant 100 souches anaérobies strictes appartenant à 62 espèces différentes, ne trouvent comme acides volatils que les acides de  $C_1$  à  $C_5$  de la série aliphatique. En 1946, Prévot et Zimmès [2] signalent également la présence d'acide caproïque dans les cultures de *Cl. caproicum*. Barker et ses collaborateurs [3, 4, 5, 6, 7] montrent la formation d'acides *n*-caproïque et butyrique par *T. kluyveri* (*Cl. kluyveri*) à partir d'éthanol et d'acétate.

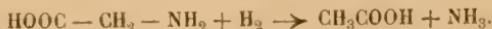
Nous nous occuperons plus particulièrement dans ce rapport des cas où la nature des acides a été établie avec une certitude suffisante et leur mode de formation précisé dans une certaine mesure. Il est nécessaire de faire, dès le départ, une distinction entre les acides provenant de la dégradation d'amino-acides et d'autres corps azotés et ceux provenant de la dégradation des glucides.

## A. — ACIDES VOLATILS PROVENANT DE LA DÉGRADATION DES AMINO-ACIDES.

Nous allons passer en revue les travaux qui ont été effectués sur la désamination des amino-acides, en ne retenant pour les besoins de notre exposé que ceux qui ont été effectués avec des cultures pures et pour lesquels les acides volatils formés ont été détectés ou déterminés.

(\*) Nous avons adopté pour les noms des anaérobies cités la nomenclature de Prévot [50]. Dans les cas où ces noms diffèrent de la nomenclature de Bergey, le nom correspondant à cette dernière figure entre parenthèses.

a) *Glycine*. — Selon Brasch [8], il se produit dans les cultures de *Pl. lentoputrescens* (*Cl. lentoputrescens*) une désamination réductrice de la glycine, selon :



Les suspensions cellulaires de *Pl. tetanomorphum* (*Cl. tetanomorphum*) [9], de *Cl. sporogenes* [10, 11, 12], de *Cl. histolyticum* [13], de *W. perfringens* (*Cl. welchii*) [14], de *Pl. tetani* (*Cl. tetani*) et de *Cl. botulinum A et B* [15, 18], de *Cl. bifementans* et de *Cl. sordellii* [17], de *Cl. acetobutylicum*, *Cl. butyricum*, *Cl. flabelliferum*, *Cl. saccharobutyricum*, de *Cl. iodophilum* et d'*I. teras* (*B. teras*) [18] ne désaminent pas la glycine. Les mêmes résultats négatifs ont été retrouvés avec quelques autres anaérobies [19, 20].

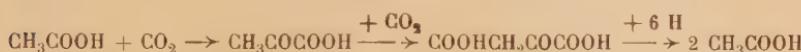
Le seul anaérobie dont les suspensions lavées aient été trouvées désaminer la glycine est *Diplococcus glycinophilus*. Cet organisme a été isolé par Cardon [21]. Il a été par la suite étudié en détail par Cardon et Barker [22, 23], qui ont montré que le seul composé attaqué d'une manière appréciable par ce germe est la glycine. La sérine et le pyruvate sont faiblement attaqués en présence de glycine seulement. Les bilans de l'attaque de la glycine par les suspensions lavées de cette bactérie correspondent à l'équation suivante :



Les auteurs ont vu [23] que seuls les dipeptides dans lesquels le groupe carboxyle de la glycine est libre sont décomposés. Le seul composé contenant deux liaisons peptidiques qui soit dégradé est l'hippurylglycine. Dans certaines conditions, il se forme aussi de l'hydrogène comme produit de la dégradation de la glycine. Les auteurs ont étudié l'influence de la pression en hydrogène sur cette formation.

D'expériences effectuées par Barker, Volcani et Cardon [24] avec du  $\text{C}^{14}$  il ressort qu'environ 75 p. 100 du méthyle et 54 p. 100 du carboxyle de l'acide acétique proviennent du carbone méthénique de la glycine ; que 90 à 95 p. 100 du  $\text{CO}_2$  proviennent du carboxyle de la glycine. Ces observations indiquent qu'une des réactions principales de cette fermentation est la condensation de deux molécules de glycine ou d'un de ses dérivés par l'intermédiaire des groupes méthéniques. Les carbones terminaux du composé résultant, peut-être un acide dicarboxylique en  $\text{C}_4$ , sont transformés principalement en  $\text{CO}_2$ , les deux atomes de carbone centraux étant oxydés en acide acétique. De plus, au moins 6 p. 100 du méthyle et 38 p. 100 du carboxyle de l'acétate proviennent du  $\text{CO}_2$ . Il n'y a pas de réduction directe de la glycine en acide acétique. D'autre part, le fait que l'acide acétique ne soit

pas métabolisé élimine la possibilité que la fixation de  $\text{CO}_2$  observée implique la suite de réactions suivantes :

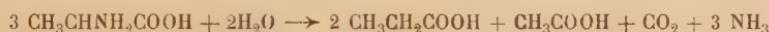


d'où résulterait une redistribution effective du carbone marqué dans la molécule d'acide acétique.

b) Alanine. — Brasch [8] rapporte pour l'alanine des résultats analogues à ceux obtenus pour la glycine avec les cultures de *Pl. lentotutrescens*.

Pour les résultats négatifs obtenus avec des suspensions, voir [9, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20].

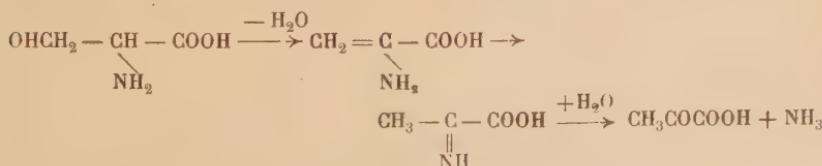
Cardon [21] rapporte l'isolement d'un organisme, *End. propionicus* (*Cl. propionicum*), étudié plus en détail par Cardon et Barker [22, 23], qui, parmi de nombreux composés essayés, ne fermente que la DL-alanine, la DL-séroline, la DL-thréonine, le pyruvate, l'acrylate, la L-cystéine et le DL-lactate. Les résultats de l'analyse des produits de la dégradation de lalanine par les cultures de cet organisme sur un milieu où les seuls constituants organiques étaient lalanine et de l'autolysat de levure correspondent à l'équation suivante :



Il s'agit donc d'une fermentation propionique de l'alanine.

c) Sérine. — De nombreuses espèces anaérobies attaquant cet amino-acide ont été décrites. Les cultures de *Pl. lentoputrescens*, selon Brasch [8], désaminent cet amino-acide en donnant les acides propionique et formique,  $\text{NH}_3$  et des produits non identifiés.

Les suspensions lavées de *Pl. tetanomorphum* [9], d'*End. propionicus* [21, 22, 23], de *Cl. botulinum* [46], de *Pl. tetani* [45, 25], de *Cl. bifermentans* et de *Cl. sordellii* [47], de *W. perfringens* [14, 26, 27] désaminent cet amino-acide. Chargaff et Sprinson [26, 27] ont montré avec *W. perfringens* la formation d'acide pyruvique à partir de sérine en présence d'arsénite ; ils ont vu d'autre part que le groupe OH alcoolique de la sérine doit être obligatoirement libre ; ainsi la DL-O-éthylsérine, la L-phosphosérine et la phosphatidylsérine ne sont pas attaquées. Ces faits leur suggèrent le mécanisme suivant, le premier stade de la dégradation étant une déshydratation :



Ces auteurs n'ont pas cherché les acides volatils formés.

Cardon et Barker [23], avec *End. propionicus*, trouvent la relation suivante :



Clifton [28], avec des suspensions lavées de *Cl. botulinum* type A, suggère que la dégradation de la sérine par cet organisme correspond à l'équation suivante :



Le même auteur, étudiant la dégradation de cet amino-acide par *Pl. tetani* [15], trouve, outre les acides butyrique et acétique, une quantité importante d'alcools, exprimée en éthanol.

Cohen, Nisman et Cohen-Bazire [29] trouvent, à partir de la sérine, une formation en quantité équimoléculaire d'acides butyrique et acétique avec les suspensions lavées de *Cl. saccharo-butyricum*, ce qui correspond aux résultats de Clifton avec *Pl. tetani*.

d) *Valine*. — Aucun anaérobiose n'a été trouvé jusqu'ici dont les suspensions lavées attaquent cet amino-acide. Pour les résultats négatifs, voir glycine et alanine. Nous verrons plus loin que la valine, comme ces deux amino-acides, est désaminée avec production d'acides volatils par réaction de Stickland.

e) *Thréonine*. — Woods et Trim [14] trouvent avec les suspensions de *W. perfringens* une désamination de cet amino-acide avec formation de  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{NH}_3$ . Ils n'ont pas étudié les acides formés. Chargaff et Sprinson [27] ont isolé à partir du même organisme agissant sur cet acide aminé l'acide  $\alpha$ -cétobutyrique, qui se forme par désamination oxydative. Cardon et Barker [23] écrivent pour la fermentation propionique de la thréonine par les suspensions de *End. propionicus*, l'équation suivante :



Une publication antérieure donnait une fermentation butyrique-acétique au lieu de butyrique-propionique. Ce résultat était dû à l'imprécision de la méthode de Duclaux pour les mélanges en cause.

Cohen, Nisman et Cohen-Bazire [29] trouvent avec les suspensions de *Cl. saccharo-butyricum* une production d'acide propionique et acétique dans la proportion de  $\text{P/A} = 1/2$ .

Signalons, parmi les auteurs qui ont rapporté des désaminations de la thréonine sans rechercher les acides volatils formés, Pickett [25] pour *Cl. tetani*, Nisman [19] pour *Cl. acetobutylicum*, Nisman et Thouvenot [20] pour une série de germes du groupe de *Cl. sporogenes*.

Barker et Wiken [30] ont étudié plus en détail le mécanisme

de la formation de l'acide butyrique dans la dégradation de la thréonine par les suspensions de *End. propionicus*, afin de voir si, comme dans de nombreux autres cas, l'acide butyrique se forme par condensation de deux molécules d'acide acétique ou d'un de ses dérivés. A cet effet, ils ont incubé la thréonine avec les suspensions lavées en présence d'acétate marqué avec du C<sup>14</sup> sur les deux carbones. Après séparation chromatographique par la méthode d'Elsden [31] du mélange d'acides résultant de la fermentation, ils ont vu que la presque totalité de la radioactivité se retrouvait dans l'acide acétique, ce qui exclut formellement ce dernier comme intermédiaire dans la formation de l'acide butyrique à partir de thréonine.

f) *Leucine*. — Schmidt, Peterson et Fred [32] font état d'une formation d'acide *l*-leucique :



par désamination hydrolytique de la leucine dans les cultures de *Cl. acetobutylicum*.

Aucune suspension d'anaérobiose ne s'est trouvée dégrader la leucine. Nous verrons que si l'on opère en présence d'un accepteur d'hydrogène, on obtient une désamination de cet acide aminé avec des suspensions de germes donnant la réaction de Stickland.

g) *Isoleucine*. — Aucune suspension d'anaérobies ne s'est montrée active sur cet acide aminé. La remarque faite à propos de la valine et de la leucine en ce qui concerne les désaminations couplées s'applique également ici.

h) *Acide aspartique*. — Brasch [8] observe sous l'action des cultures de *Pl. lentoputrescens* une formation d'acides succinique et propionique à partir de cet acide aminé. Cohen, Nisman et Cohen-Bazire [29] trouvent sous l'action des bactéries lavées de *Cl. saccharobutyricum* sur l'aspartate une formation d'acides butyrique et acétique dans la proportion de B/A = 1/1.

Cohen-Bazire et Cohen [33] ayant observé que le même germe fermente l'acide oxaloacétique en donnant les mêmes produits volatils, on est en droit de penser que l'attaque de l'acide aspartique comporte une désamination primaire, puis une décarboxylation de l'acide oxaloacétique suivie d'une fermentation de l'acide pyruvique suivant les caractéristiques que Cohen et Cohen-Bazire [34, 35, 36] ont précisées pour cet organisme.

Parmi les auteurs qui ont observé des dégradations de l'aspartate sans étudier les produits volatils formés, il faut citer Woods et Clifton [9] avec *Pl. tetanomorphum*, Clifton [15] et Pickett [25] avec *Pl. tetani*, Nisman [19] avec *Cl. acetobutylicum*.

i) *Acide glutamique*. — Un mémoire très détaillé a été consacré par Woods et Clifton [37] à la dégradation de l'acide glutamique

par les suspensions de *Pl. tetanomorphum*. Ces auteurs ont identifié les acides butyrique et acétique à l'état de sels de quinine. L'étude de leurs bilans leur a permis d'écrire la réaction suivante :



Barker [38], dans des expériences en croissance avec une clostridie non identifiée, trouve les mêmes produits et les mêmes relations quantitatives. Cet organisme devait être par la suite identifié par le même auteur à *Pl. cochlearium* (*Cl. cochlearium*) [39]. Clifton [45] trouve des résultats comparables avec *Pl. tetani* ( $B/A = 1/2$ ), de même que Cohen, Nisman et Cohen-Bazire [29] avec *Cl. saccharobyticum* ( $B/A = 1/2$ ). Ces derniers auteurs ont caractérisé l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique comme produit primaire de cette réaction. Ils ont également vérifié que le même organisme dégrade l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique avec formation des mêmes acides dans la même proportion. Alors que la désamination primaire du glutamate est relativement rapide, l'attaque ultérieure du cétoglutarate est une réaction lente.

j) *Phénylalanine*. — Tous les essais effectués par divers auteurs avec des suspensions d'anaérobies stricts ont donné des résultats négatifs.

k) *Tyrosine*. — Brasch [8] rapporte que les cultures de *Pl. lentotuberculosis* réduisent la tyrosine en acide *p*-hydroxyphénylpropionique. Janke [40] et Rhein [41] notent la formation de *p*-crésol avec *Cl. cresologenes*, espèce dont malheureusement aucune souche ne se trouve plus dans les collections. Avec *Pl. tetani* et *Pl. tetanomorphum* (*Cl. pseudotetanicum*), Rhein [41] trouve une formation de phénol à partir de tyrosine. Prévot et Saissac [42] obtiennent dans des expériences de croissance du phénol avec *L. teras* et du *p*-crésol avec *Cl. corallinum*, à partir de la tyrosine.

l) *Tryptophane*. — Aucune bactérie anaérobie n'a fourni jusqu'ici de suspensions capables de désaminer cet amino-acide.

m) *Cystine*. — Woods et Clifton [9] n'ont pas étudié les produits volatils acides formés lors de la dégradation de cet amino-acide par les suspensions de *Pl. tetanomorphum*.

n) *Cystéine*. — Même remarque que ci-dessus pour le travail de Woods et Clifton [9].

o) *Méthionine*. — Woods et Clifton [9], avec *Pl. tetanomorphum*, Pickett [25] avec *Pl. tetani* n'ont pas recherché les produits volatils qui se forment lors de la désamination de la méthionine par ces organismes. Nisman et Thouvenot [20], en présence d'arsénite de sodium, ont isolé à partir de la méthionine et de suspensions de *Cl. sporogenes* l'acide  $\alpha$ -cétogamma-méthiobutyrique. Ils ont noté également la formation de mercaptan.

p) *Lysine*. — Aucun anaérobie étudié n'a été trouvé désaminer cet amino-acide.

q) *Arginine* et *ornithine*. — Ces amino-acides, désaminés par de nombreuses espèces anaérobies, ne donnent pas naissance à des acides volatils, mais dans les cas qui ont été étudiés en détail, de l'acide  $\alpha$ -aminovalérianique [41].

r) *Histidine*. — Woods et Clifton [9] ne recherchent pas les produits volatils de la désamination de ce corps par *Pl. tetanomorphum*. Pickett [25] montre que les suspensions de *Pl. tetani* désaminent l'histidine avec ouverture du noyau imidazole, les acides volatils formés étant les acides butyrique et acétique dans les proportions respectives de 0,31 et 2,11 moles par mole d'histidine fermentée. Cohen, Nisman et Cohen-Bazire [29] observent un phénomène analogue avec les suspensions de *Cl. saccharobutyricum* où ils trouvent une formation d'acides butyrique et acétique dans la proportion B/A = 1/2. Ils proposent que l'ouverture du cycle imidazole se fait sous l'influence d'une histidase analogue à celle découverte par Edlbacher et Kraus dans les tissus [43] et qui implique une formation intermédiaire d'acide glutamique.

s) Nous verrons que la *proline* et l'*hydroxyproline* ne sont attaquées par les suspensions de bactéries anaérobies qu'en présence d'un acide aminé donneur d'hydrogène (alanine, valine, leucine ou isoleucine par exemple).

#### B. — ACIDES VOLATILS FORMÉS PAR RÉACTION D'OXYDO-RÉDUCTION ENTRE PAIRE D'AMINO-ACIDES. RÉACTION DE STICKLAND.

Stickland [10], raisonnant à partir des expériences de Knight et Fildes [44] sur la nutrition de *Cl. sporogenes*, trouve que l'énergie nécessaire à la croissance de ce germe est due à une réaction anaérobie entre acides aminés. Il met les acides aminés en présence de suspensions de *Cl. sporogenes* dans des tubes de Thünberg avec du bleu de méthylène ou du bleu de crésyl brillant comme indicateurs d'oxydo-réduction. Il voit ainsi que l'alanine, la valine, la leucine et le pyruvate sont de bons donneurs d'hydrogène. En utilisant le leucodérivé du benzylviologène, il observe que les acides aminés suivants sont des accepteurs d'hydrogène : glycine, proline et hydroxyproline. Puis il met en contact un acide aminé donneur d'hydrogène avec un acide aminé accepteur en présence de bactéries lavées dans des tubes de Thünberg et mesure la désamination. Il observe que les deux acides aminés sont désaminés alors que chacun, individuellement, ne l'était pas. Les résultats de Stickland peuvent se représenter pour l'alanine et la glycine de la manière suivante, selon ses résultats [44] :



On imagine aisément, quand il s'agit d'anaérobies stricts, l'importance de l'existence d'une réaction qui fait intervenir d'autres accepteurs d'hydrogène que l'oxygène.

Avec la proline comme donneur d'hydrogène, Stickland [44] observe que la réduction de la proline se fait sans désamination et donne naissance à l'acide  $\epsilon$ -aminovalérianique que Neuberg [45] et Ackermann [46] avaient caractérisé dans les cultures mixtes des bactéries de la putréfaction.

Il est vraisemblable, selon Stickland, que l'oxydation de lalanine se fait alors selon :



Il y aurait d'abord passage par l'acide pyruvique

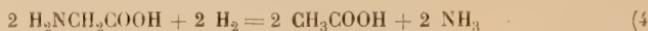


Sous l'action de la pyruvate déshydrogénase, on aurait :



la réaction (1) représentant la somme des deux réactions (2) et (3).

La réduction de la glycine utilise les 2  $\text{H}_2$  formés lors de l'oxydation de lalanine et est accompagnée d'une désamination :

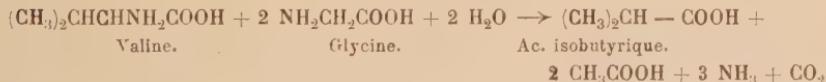


La réaction de Stickland proprement dite est alors représentée par la somme des deux réactions (1) et (4). En présence d'arsénite de Na  $10^{-3}$  M, la réaction de Stickland est totalement inhibée. Cependant, Nisman et Vinet ont montré qu'en présence de cet inhibiteur et de bleu de méthylène comme accepteur d'hydrogène, l'oxydation du substrat donneur se poursuit normalement, alors que la réoxydation par la glycine de la leuco-phénosafranine est inhibée. Ceci permet d'envisager l'existence de deux enzymes distincts dans la désamination couplée [58 d].

Woods [41] montre que l'ornithine et l'arginine sont aussi des accepteurs d'hydrogène. Leur réduction donne naissance ici encore à l'acide  $\epsilon$ -aminovalérianique. Cet auteur remarque qu'il n'y a pas de spécificité chimique pour les acides aminés accepteurs, mais que par contre, seules les formes naturelles des acides aminés donneurs peuvent jouer dans le couple. A la valine et à la leucine, montrées par Stickland être de bons donneurs, Hoogerheide et Kocholaty [47] ajoutent l'isoleucine.

Ces auteurs n'ont pas fait pour la valine, la leucine et l'isoleucine une étude parallèle à celle que Stickland [44] avait faite pour lalanine. C'est ce que Cohen-Bazire, Cohen et Prévot [48, 49] ont fait en partant de prémisses absolument différentes : Prévot et Zimmès [2] et Prévot [50] avaient établi que les espèces *Cl. vale-*

*rianicum* et *Cl. caproicum* produisent respectivement une fermentation valérianique-acétique et une fermentation caproïque-acétique quand elles sont cultivées sur bouillon à base de digestion de viande et de foie glucosée à 10 p. 100. Cohen-Bazire, Cohen et Prévot [48, 49] ont vu que cette fermentation se fait aussi bien en milieu non glucosé et ont alors pensé que les acides valérianique et caproïque ne sont pas dans ce cas des catabolites provenant de la dégradation du glucose. A partir de ce substrat, comme à partir du pyruvate, il ne se forme que de l'acide acétique. Les auteurs ont ensuite établi que pour des mélanges isobutyrique-acétique, isovalérianique-acétique, *n*-caproïque-acétique, dans des proportions allant de 1/2 à 1/1, l'indétermination la plus absolue règne quant à la nature de l'acide supérieur. Etant donné que ce sont dans ces proportions que se présentent les acides des cultures de ces deux germes, leur identité restait incertaine. Les auteurs ont alors pensé que les acides provenaient peut-être des acides aminés ramifiés valine, leucine et isoleucine. En faisant agir les suspensions lavées de *Cl. caproicum* et de *Cl. valerianicum* sur ces amino-acides, ils n'ont observé ni désaminations, ni formation d'acides volatils. Par contre, les auteurs ont pu faire désaminer ces trois corps par les bactéries lavées en présence d' amino-acides accepteurs d'hydrogène, tels que la glycine ou la proline, dans les conditions définies par Stickland pour lalanine avec *Cl. sporogenes*. Les bilans de Cohen-Bazire, Cohen et Prévot [49] leur permettent d'écrire pour la valine par exemple l'équation suivante :



L'exactitude de ces équations a été vérifiée par les dosages d'ammoniaque, la mesure de l'acidité volatile, la recherche de la nature et de la proportion des acides volatils formés. La réalité du dégagement de  $\text{CO}_2$  a été également vérifiée par la technique de Warburg. Avec la glycine comme accepteur, les auteurs ont retrouvé les mêmes indéterminations que dans les cultures quant à la nature des acides formés, à cause de la grande proportion d'acide acétique. Mais en utilisant la proline comme accepteur, cette dernière donnant l'acide  $\alpha$ -aminovalérianique non volatile, ils ont caractérisé avec certitude avec les deux espèces étudiées et avec *Cl. sporogenes* l'acide isobutyrique dans le cas de la valine et l'acide isovalérianique dans le cas de la leucine. En ce qui concerne l'isoleucine, l'acide obtenu n'a pu être caractérisé avec certitude faute de la connaissance des constantes de distillation de Duclaux de l'acide valérianique optiquement actif, qui doit cepen-

dant se former si le mécanisme pour l'isoleucine est le même que pour la valine et la leucine, ce qui est très probable. L'acide obtenu ne correspond dans tous les cas pas à l'acide caproïque optiquement actif, qui pourrait provenir d'une désamination réductrice de l'isoleucine et dont les auteurs ont établi les constantes de distillation. Voici donc un cas où l'imprécision de la méthode de Duclaux avait fait croire à la formation d'acides *n*-caproïque et valérianique.

Neuberg et Karezag [51] ont autrefois décrit des processus de désamination réductrice donnant respectivement, à partir de la valine et de l'isoleucine, les acides isovalérianique et caproïque optiquement actif sous l'influence de « cultures mixtes ». L'acide caproïque optiquement actif a été récemment trouvé par Sabetay et Panouse [52] dans le tabac fermenté et par Quebedeaux et al. [53] dans les pétroles dont on connaît la théorie bactérienne de formation. Or, pas plus que Cohen-Bazire, Cohen et Prévot n'ont pu la réaliser, il n'existe dans la littérature de mention de désaminations réductrices de la valine, de la leucine et de l'isoleucine par des suspensions d'anaérobies. Il reste à montrer soit l'existence de germes capables de réaliser de telles réactions, soit l'existence d'une réaction couplée d'un nouveau type où ces amino-acides joueraient le rôle d'accepteurs d'hydrogène et non plus de donneurs. Wagner, Meyer et Dozier [54] ont observé une accumulation considérable d'ammoniaque et d'acides volatils dans les cultures de *Cl. botulinum* sur bouillon peptoné ; les acides étaient un mélange d'acides « valérianique », butyrique et acétique. Clifton [16 b] a montré que *Cl. botulinum* est capable de réaliser des réactions de Stickland et pense que l'acide valérianique de Wagner, Meyer et Dozier pourrait peut-être provenir de la désamination par certaines souches de *Cl. botulinum* de l'acide  $\alpha$ -aminovalérianique provenant de la réduction de la proline. Nous savons maintenant que l'acide « valérianique » est probablement un mélange d'acides isobutyrique, isovalérianique et valérianique optiquement actif et que ces acides tirent leur origine des acides aminés ramifiés, par réaction de Stickland.

Outre *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum*, *Cl. valerianicum* et *Cl. caproicum*, Nisman, Raynaud et Cohen [55, 56] ont étendu la réaction de Stickland aux espèces *Cl. histolyticum*, *Cl. flabelliferum*, *Cl. saprotoxicum*, *Cl. sordellii*, *Cl. bifermentans*, *Cl. butyricum*, *Cl. acetobutylicum*, *L. indolicus*. Les espèces *Cl. saccharo-butyricum*, *Pl. tetani*, *Cl. iodophilum*, *Pl. tetanomorphum*, *W. perfringens* et *L. teras* se sont montrées incapables de réaliser des réactions de Stickland, quel que soit le couple d'amino-acides étudié. Il semble en gros que l'existence des enzymes de Stickland chez les *Clostridiaceae* soit limitée aux espèces protéolytiques. Remarquons que les espèces donnant la réaction de Stickland

donnent en culture un mélange d'acides en C<sub>5</sub>, C<sub>4</sub> et d'acide acétique alors que les autres espèces étudiées ont un type butyrique-acétique. Ces derniers acides provenant alors de la dégradation du glucose et de la désamination des amino-acides, qui donne principalement les acides butyrique et acétique avec la plupart des *Clostridiaceæ*.

Raynaud et Macheboeuf [57] ont montré que la réaction de Stickland provoquée par les suspensions de *Cl. sporogenes* est inhibée en présence de glucose. En culture également, la présence de glucides fermentescibles inhibe la formation du mélange d'acides ramifiés dont le mode de formation par réaction de Stickland a été précisé par Cohen-Bazire et al. [48, 49]. Saissac, Raynaud et Cohen [58] ont montré qu'en présence de glucose le type fermentaire passe au type *n*-butyrique-acétique chez *Cl. sporogenes* et d'autres espèces donnant la réaction de Stickland. Enfin, Nisman et Thouvenot [20] ont montré que *Cl. aerofætidum*, *Cl. carnofætidum*, *Cl. mitelmani* et *Cl. ghoni* possèdent également les enzymes de la réaction de Stickland. Nisman, Raynaud et Cohen [56] ont montré que dans cette réaction le glucose, le pyruvate, l'acétaldéhyde et l'éthanol, mais non le lactate et le succinate, pouvaient remplacer l'acide aminé donneur d'hydrogène ; la glycine, par exemple, est aussi bien désaminée en présence de ces corps qu'en présence d'alanine (2).

#### C. — COMPOSÉS AZOTÉS AUTRES QUE LES AMINO-ACIDES.

Barker et Beck [59, 60] ont montré que *End. acidi-urici* (*Cl. acidi-urici*) et *End. cylindrosporus* (*Cl. cylindrosporum*) décomposent l'acide urique avec formation de CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, d'acide acétique et de glycine. Barker et Peterson [61], étudiant les besoins nutritionnels d'*End. acidi-urici* ont montré que cet organisme est capable de croître sur un milieu entièrement synthétique dont tous les acides aminés et facteurs de croissance avaient été exclus. Le remarquable pouvoir de synthèse de cette bactérie avait déjà été entrevu par Barker, Ruben et Beck [62] qui avaient montré qu'elle était capable de former de l'acide acétique à partir de CO<sub>2</sub>. Barker et Elsden [63] ont montré que si l'acide urique est fermenté par *End. cylindrosporus* en présence de CO<sub>2</sub> marqué avec du C<sup>14</sup> on retrouve l'isotope dans l'acide acétique et la glycine. La comparaison des activités spécifiques des atomes de

(2) Rosenberg et Nisman [58 a, 58 b] et Nisman et Vinet [58 c] ont montré que *Cl. sporogenes* et *Cl. saccharobutyricum* désaminent un certain nombre d'acides aminés en présence d'oxygène. Il se forme les acides cétoniques correspondants. L'oxygène joue dans ce cas le rôle d'accepteur d'hydrogène.

carbone de l'acide acétique et de la glycine prouve que ces composés sont formés par des réactions différentes et ne sont pas interconvertibles. Ceci est en accord avec les résultats de Sonne, Buchanan et Dellaqua [64] sur la non-interconvertibilité de la glycine et de l'acide acétique chez le Pigeon.

L'activité spécifique faible du carbone du carboxyle de l'acide acétique indique que ce dernier ne dérive pas en totalité du  $\text{CO}_2$ , mais doit être formé en partie directement à partir de l'acide urique. Le carbone du groupe méthyle de l'acide acétique et le carbone carboxylique de la glycine ne diffèrent pas sensiblement dans leurs activités spécifiques et peuvent dériver entièrement du  $\text{CO}_2$ . Il est hors de doute que la question du mode de dégradation de l'acide urique trouvera une solution grâce à l'élégante technique de Karlsson et Barker [65] consistant à obtenir de l'acide urique marqué sur diverses positions avec du carbone radioactif en isolant cet acide à partir de Pigeons nourris avec divers composés radioactifs. Sonne et al. [66, 67] avaient étudié le rôle du lactate, de l'acétate, du formiate de la glycine et du  $\text{CO}_2$  dans la biosynthèse de l'acide urique. Karlsson et Barker [65], en donnant aux Pigeons du formiate marqué, isolent de l'acide urique marqué sur les positions 2 et 8 ; avec du bicarbonate marqué, l'acide urique est marqué en 6 ; avec de la glycine marquée sur le carboxyle, on obtient un acide urique dont le carbone 4 est radioactif ; par contre, si la glycine possède le carbone méthylénique marqué, on obtient un acide urique marqué en 5, mais contenant des proportions considérables de carbone radioactif en 2, 4, 6 et 8, donc difficilement utilisable pour les études métaboliques, en particulier pour celles portant sur l'origine de l'acide acétique dans cette dégradation, puisque c'est cet aspect particulier qui intéresse ce rapport.

## II

FORMATION D'ACIDES VOLATILS A PARTIR DE GLUCIDES,  
DE DÉRIVÉS DE GLUCIDES ET PLUS GÉNÉRALEMENT  
DE COMPOSÉS TERNAIRES.

Nous avons choisi de présenter les résultats de la littérature en les classant suivant la nature des acides volatils formés.

1. ACIDE FORMIQUE. — On trouve en 1910 dans Jungano et Distaso [68] une mention de production d'acide formique dans les cultures du microbe de Ghon et Sachs (1903). Ce microbe n'est pas suffisamment décrit pour savoir à quelle espèce il correspond. Pringsheim [69, 70] a vu que des bactéries cellulolytiques peuvent produire les acides formique et acétique ; ici encore, les souches utilisées n'ont pas été rigoureusement déter-

minées. Il en a été de même pour les cellulolytiques étudiés par Werkman et Stritar [71], donnant le même mélange d'acides. Pochon [72] a trouvé le même mélange comme produits terminaux de la fermentation de la cellulose par *Pl. cellulolyticum*, organisme n'attaquant la cellulose qu'en anaérobiose stricte. Le même fait a été observé par Meyer [73] chez un cellulolytique voisin. Prévot et Veillon [74, 75] ont décelé les mêmes acides sur les cultures en bouillon glucosé de *Ram. ramosum* et de *Fusocillus girans*. Il en a été de même pour *Ristella clostridiiformis* [76] et pour *Strep. anaerobius* [77], les acides acétique et formique étaient associés à l'acide butyrique chez *Strep. foetidus* [77]. *Strep. productus* donnait les acides propionique et formique [77]. Prévot et Loth [78] trouvent dans les cultures de *Ram. pseudo-ramosum* les acides « valérianique » et formique et dans celles de *Cl. pseudo-fallax* [79] les acides butyrique et formique. Prévot et Loth ont donné les constantes de Duclaux de l'acide formique, les courbes de distillation des mélanges binaires d'acide formique et d'autres acides volatils et ont étudié la fréquence de la fermentation formique [80]. Sur le mode de formation de l'acide formique chez les anaérobies, on ne possède aucune indication. Woods et Clifton [45] ont noté l'absence de l'hydrogénelyase formique chez *Pl. tetanomorphum*; il en a été de même pour Clifton [45] avec *Pl. tetani* et pour Koepsell et Johnson [81] avec *Cl. butylicum*.

**II. ACIDE ACÉTIQUE.** — Cet acide se rencontre associé à d'autres acides volatils ou à de l'acide lactique dans de nombreuses espèces anaérobies. Sur 100 souches étudiées par Prévot et Taffanel [4], l'acide acétique a été rencontré quatre-vingt-cinq fois. Deux fois seulement l'acide acétique était le seul acide volatile, dans le cas de *Diplococcus magnus* et d'un *Endosporus*. Une fois, l'acide acétique était associé à l'acide lactique, dans le cas de *Diplococcus plagarum belli*.

D'autre part, Fontaine, Peterson, McCoy, Johnson et Ritter [82] et Barker [83] ont montré que *Pl. thermoaceticum* (*Cl. thermoaceticum*) fermente les sucres en ne donnant que de l'acide acétique comme acide volatile. Les mécanismes décrits pour la formation de l'acide acétique sont multiples :

a) *Synthèse totale de l'acide acétique à partir du CO<sub>2</sub>*. — De tels mécanismes ont été décrits dans l'ordre chronologique pour *Cl. aceticum*, *Pl. thermoaceticum*, *End. acidi-urici*, *Eub. rettgeri* (*Butyribacterium rettgeri*) et *Diplococcus glycinophilus*. Le professeur Barker a traité ce point particulier dans son rapport et nous n'y reviendrons pas. Pour la bibliographie, voir 62, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88.

b) *Production d'acide acétique à partir de pyruvate*. — Woods

et Clifton [37] ont établi les bilans de la fermentation du pyruvate par les suspensions lavées de *Pl. tetanomorphum* et ont montré qu'il se formait entre autres de l'acide acétique. Leurs résultats seront analysés plus en détail à propos de l'acide butyrique. Clifton [89], avec les suspensions de *Cl. botulinum*, a montré qu'il se forme environ 0,45 moles d'acétate par mole de pyruvate disparu, les autres produits étant l'éthanol (0,55 moles) et  $\text{CO}_2$  (0,89 moles). Il représente les résultats obtenus par l'équation :



Le même auteur [45], avec *Pl. tetani*, trouve 0,18 moles d'acétate par mole de pyruvate consommé, les autres produits étant le butyrate, le lactate et le  $\text{CO}_2$ .

Une catégorie de germes très étudiés à propos de la formation d'acétate à partir de pyruvate est celle des bactéries butyriques et acétono-butyriques. Nous les étudierons plus en détail à propos de la fermentation butyrique. Citons seulement un travail effectué avec un extrait par Kepsell et Johnson [81]. Ces auteurs ont vu qu'un extrait de *Cl. butylicum* fermente le pyruvate selon :



Kepsell, Johnson et Meek [90] ont par la suite montré que cette réaction se fait par l'intermédiaire de l'acétylphosphate selon :



L'extrait utilisé était inactif sur les acides formique, lactique, succinique, 3-phosphoglycérique ainsi que sur le glucose. Ce dernier résultat a été utilisé par Simon [91, 92] pour exclure le pyruvate comme intermédiaire dans la fermentation acétono-butyrique. Cette argumentation sera discutée plus bas. Le fait que l'acide formique ne soit pas attaqué exclut que  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$  prennent naissance à partir de ce substrat sous l'influence de l'hydrogénelyase formique.

Peldān [93, 96] faisant agir des suspensions de *Granulobacter saccharobutyricum* Beijerinck, en tampon phosphaté sur du pyruvate, trouve de l'acétale avec de petites quantités de lactate et de formiate. Simon [91, 92] ne trouve par action de suspensions de *Cl. acetobutylicum* sur le pyruvate que de l'acétate. La question de la production ou non de corps en  $C_4$  à partir de pyruvate par les bactéries de ce groupe sera largement discutée plus loin à propos de l'acide butyrique.

Pour une revue générale sur l'acétylphosphate, voir Lipmann [97].

c) *Production d'acide acétique à partir de glucose.* — Les intermédiaires de la glycolyse jusqu'au stade pyruvate ont été très

peu étudiés chez les bactéries, en particulier chez les anaérobies. Stone et Werkman [98] n'ont pas pu détecter la formation d'acide phosphoglycérique avec les bactéries butyliques, alors qu'ils avaient pu le faire avec d'autres bactéries. Pett et Wynne [99] et Osburn, Brown et Werkman [100] ont isolé le méthylglyoxal à partir du glucose ainsi que Simon [91, 92] à partir d'hexosedi-phosphate, avec des bactéries butyliques. Cependant, Johnson, Peterson et Fred [101] pensent que le méthylglyoxal n'est vraisemblablement pas un intermédiaire de la fermentation butyrique, vu sa haute toxicité pour les bactéries.

Simon [91, 92] note entre autres la production d'acide acétique à partir de glucose sous l'influence de suspensions lavées de *Cl. acetobutylicum*. De même, Peldan [93, 96] avec *Granulobacter saccharobutyricum*, Lerner et Pickett [102] avec *Pl. tetani*, Clifton [16 b] avec *Cl. botulinum*, types A et B. Dans les multiples expériences en croissance effectuées sur bouillon glucosé, citrons Boorsma, Prévot et Veillon [103] avec *Pl. tetani*.

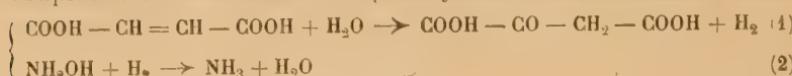
d) *Production d'acide acétique à partir de divers autres substrats.* — 1<sup>o</sup> *Acétaldéhyde.* — Janke et Siedler [104] ont montré que des suspensions cellulaires de *Cl. butylicum* fermentent l'acétaldéhyde dont la plus grande partie subit la dismutation en acide acétique et éthanol. Cohen et Cohen-Bazire (résultats non publiés) ont vu que des suspensions cellulaires de *Cl. sporogenes*, *Cl. valerianicum*, *Cl. caproicum*, *Cl. butyricum*, var. *saccharobutyricum* et *Cl. acetobutylicum* ne donnent que de l'acide acétique à partir de ce substrat.

2<sup>o</sup> *Diacides en C<sub>4</sub>.* — Simon et Weizmann [105] ont montré que l'acide succinique n'est pas fermenté par *Cl. acetobutylicum*. Ce résultat a été retrouvé par Clifton [15] avec *Pl. tetani*, ainsi que par Pickett avec le même organisme et par Cohen et al. [33, 34] avec *Cl. butyricum*, var. *saccharobutyricum*.

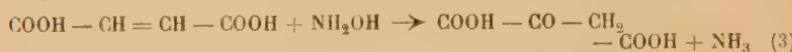
Clifton [15] note avec les suspensions de *Pl. tetani* une production de 0,1 moles d'acétate par mole de fumarate disparu, à côté d'alcool (calculé en éthanol), de malate (0,1 moles), de lactate (0,05 moles), de butyrate (0,1 moles) et de CO<sub>2</sub> (1,3 moles). Avec les mêmes suspensions, le même auteur ne note pas de fermentation du malate. Cependant, Pickett [25], avec le même organisme, montre que le malate est fermenté très lentement, les produits de fermentation étant pour 100 moles de malate disparu : CO<sub>2</sub> (82,8 moles), acétate (42 moles), butyrate (7 moles), succinate (47,4 moles), alcool (calculé en éthanol : 10,4 moles).

Cohen et Cohen-Bazire [34] ont vu que *Cl. butyricum*, var. *saccharobutyricum* fermente le fumarate, l'oxaloacétate et à une vitesse moindre le malate. Dans un mémoire détaillé sur la fermentation des diacides en C<sub>4</sub> par cet organisme, Cohen-Bazire et Cohen [33] ont montré, sur la base de ces vitesses différentes, par

l'emploi de divers inhibiteurs, en particulier du rouge Congo qui inhibe la fumarase, et par l'observation des proportions des acides butyrique et acétique formés, que le fumarate est transformé directement en oxaloacétate sans passage intermédiaire par le malate. Le schéma proposé par ces auteurs pour la fermentation du fumarate est le suivant : fumarate  $\rightarrow$  oxaloacétate  $\rightarrow$  pyruvate  $\rightarrow$  butyrate + acétate. Les mêmes auteurs ont montré [106, 33] que l'oxydation du fumarate en oxaloacétate peut être couplée à la réduction de l'hydroxylamine en ammoniac, selon :

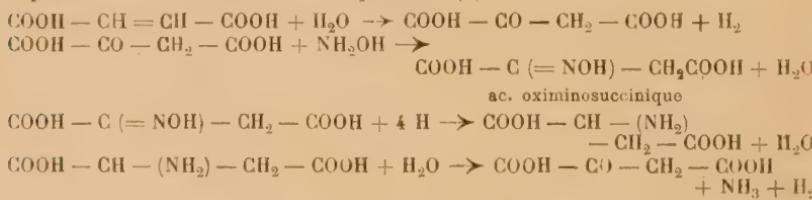


Soit :



Par chromatographie sur papier filtre selon Consden, Gordon et Martin [107], Cohen et al. [106, 33] ont montré la formation d'aspartate lors de l'incubation simultanée de fumarate et d'hydroxylamine en présence des suspensions du germe étudié.

Le schéma possible suivant est proposé, la somme des diverses équations se ramenant à l'équation (3) :



Ce mécanisme est tout à fait vraisemblable, Cohen, Cohen-Bazire, Raynaud et Nisman [108] ayant montré que l'organisme utilisé désamine effectivement l'aspartate, en donnant d'ailleurs les acides acétique et butyrique [29].

Enfin, Vaughn et al. [109, 110, 111] ont isolé un certain nombre de bactéries décomposant le D-tartrate. Ces organismes, outre leur intérêt économique, présentent un intérêt historique incontestable puisque c'est dans un milieu à base de tartrate que Pasteur [112] rencontra des organismes similaires dans ses études sur l'anaérobiose. Tabachnik et Vaughn [113] ont montré, sur une série de clostridies butyriques que les produits principaux de la fermentation du tartrate étaient les acides acétique et butyrique,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ . Le rapport molaire de l'acide acétique à l'acide butyrique était environ A/B = 10/1.

3<sup>e</sup> Acétylacétate. Stadtman et Barker [114] ont décrit une réaction hydrolytique phosphoroclastique de l'acétylacétate sous l'action des suspensions de *T. kluyveri* (*Cl. kluyveri*) donnant

naissance à une molécule d'acétylphosphate et à une molécule d'acétate, selon :



La scission hydrolytique de l'acétylacétate avait été observée pour la première fois par Lehninger [115] avec des suspensions d'*E. coli*. Elle a été retrouvée par Cohen et Cohen-Bazire [35, 116 a, 116 b] avec toutes les suspensions de bactéries butyriques et acétone-butyliques qu'ils ont utilisées.

**III. ACIDE PROPIONIQUE.** — Nous ne traiterons pas les fermentations par les *Propionibacteria*, anaérobies facultatifs. Prévot et Taffanel [1] ont rencontré dix-huit fois l'acide propionique sur 100 souches correspondant à 62 espèces différentes ; l'acide propionique était toujours associé à un ou plusieurs autres acides volatils ou fixes (lactique, succinique). Le seul mécanisme de formation de l'acide propionique qui ait été approfondi chez un anaérobie strict l'a été par Johns [117]. Cet auteur a isolé de l'intestin du Mouton un nouveau *Micrococcus* anaérobie strict qui diffère biochimiquement des *Propionibacteria* en ce qu'il ne fermente aucun des sucres essayés : toutefois, il produit l'acide propionique, ainsi que  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$  à partir du lactate. Cet organisme attaque les acides pyruvique, oxaloacétique, L-malique et fumrique en donnant les mêmes produits ; l'attaque du succinate donne comme uniques produits de la réaction du propionate et  $\text{CO}_2$ . Barker et Lipmann [118] ont donné des arguments selon lesquels le lactate n'est pas un intermédiaire dans la réduction du pyruvate en propionate chez les *Propionibacteria*. L'apparition de  $\text{C}^{13}$  dans le carboxyle de l'acide propionique formé lors de la fermentation par les *Propionibacteria* en présence de  $\text{C}^{13}\text{O}_2$  a conduit Wood, Werkman, Hemingway et Nier [119] à penser que l'acide propionique pourrait prendre naissance selon le schéma de fixation de  $\text{CO}_2$  de Wood et Werkman [120, 121] par la décarboxylation d'un des acides dicarboxyliques, peut-être l'acide succinique. Cependant, une telle réaction de décarboxylation n'avait jamais été observée avec les *Propionibacteria* vrais. La découverte de Johns [117] avec son *Micrococcus* est en accord avec le schéma postulé ci-dessus : les suspensions lavées de l'organisme produisent une décarboxylation du succinate donnant 97 p. 100 du  $\text{CO}_2$  théorique suivant l'équation :



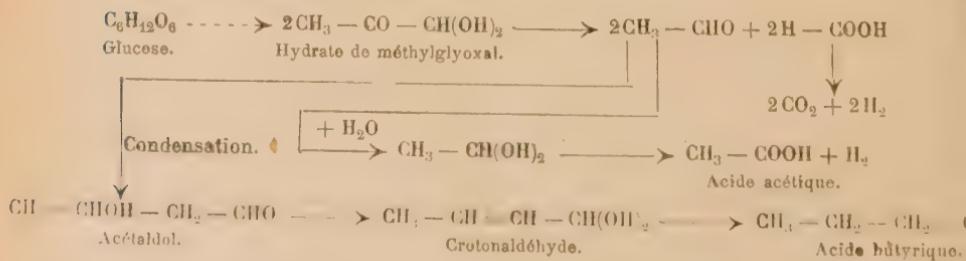
La recherche de la nature de l'acide par la méthode d'Elsden [31] montre qu'il s'agit d'acide propionique, à l'exclusion de tout autre. La réaction peut être étudiée manométriquement au pH optimum de 7,4 à 37°.

IV. ACIDE BUTYRIQUE. — De très nombreuses bactéries anaérobies produisent de l'acide butyrique. Nous laisserons volontairement de côté les fermentations butyriques causées par les organismes non sporulés et chez les sporulés, nous nous limiterons aux fermentations classiquement appelées butyrique et acétono-butylique.

Aucune fermentation bactérienne n'a été étudiée autant quant à son mécanisme que la fermentation acétono-butylique, et aucune n'a fait l'objet d'autant d'hypothèses. La production d'acide butyrique ne peut être passée en revue en faisant abstraction de la fermentation acétono-butylique. Aussi les étudierons-nous simultanément.

La production d'acide butyrique à partir des sucres sous l'influence des bactéries a été vue pour la première fois par Pasteur [122], en 1861. Après sa découverte, de nombreux mémoires ont paru entre 1880 et 1910, signés entre autres par Fitz, Baier, Winogradsky, Buchner et Meisenheimer, Schattenfroh et Grassberger, Bredemann. Une bibliographie satisfaisante de ces premiers travaux sera trouvée dans Neuberg et Arinstein [123]. Selon Kluyver [124], la fermentation butyrique la plus simple est effectuée par des bactéries butyriques « vraies » du type de *Cl. saccharo-butyricum* qui donnerait comme produits principaux uniquement les acides acétique et butyrique,  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2$ , ainsi qu'une trace d'acide formique. Par contre, certaines espèces voisines ne donnent que peu d'acide butyrique à côté de 8 ou 10 autres produits.

La fermentation butyrique vraie est peu intéressante au point de vue industriel, mais présente un grand intérêt théorique pour la compréhension des fermentations acétono-butylique et isopropanol-butylique, plus complexes. L'école de Kluyver [124, 125] a étudié cette fermentation. De ces travaux, il ressort que les premiers stades de la fermentation sont analogues aux premiers stades de la fermentation alcoolique de la levure selon le même groupe de chercheurs, c'est-à-dire que le glucose est principalement phosphorylé, coupé en deux molécules de triose intermédiaire, tel que l'hydrate de méthylglyoxal. Le schéma proposé par Kluyver est indiqué ci-dessous :



Disons immédiatement que ce schéma est hypothétique. De nombreux auteurs admettaient depuis Fitz [126] le passage par l'acétaldéhyde et l'acétaldol : Donker [127], Van der Lek [128], Bernhauer et Kürschner [129]. Cependant, l'acétaldéhyde n'a jamais pu être isolée dans les processus de fermentation butyrique ou acétono-butylique : voir Peterson et Fred [130], Osburn, Brown et Werkman [100] et Peldan [96]. La seule exception est le travail de Neuberg et Arinstein [123], mais la pureté de la souche qu'ils ont utilisée a été mise en cause par Peldan [96]. D'autre part, l'acétaldol s'est montré très toxique pour les bactéries et n'a pas été attaqué, même en solution très diluée dans les expériences de Johnson, Peterson et Fred [101] et de Bernhauer et Kürschner [129]. De plus, on n'a pas pu démontrer la présence de l'hydrogénelyase formique chez ces organismes. Neuberg et Arinstein [123] et Peldan [96] donnent un schéma proposant la formation intermédiaire d'un aldol pyruvique. Peldan, ayant observé que l'ion  $\text{Ca}^{++}$  stimule la formation de butyrate à partir de pyruvate, pense que le calcium favorise la formation de l'aldol pyruvique. Toutefois, cette action favorisante du calcium n'a pu être retrouvée par Simon [92].

On voit donc que le schéma de Kluyver est actuellement bien ébranlé. Il est intéressant de passer en revue les expériences faites avec divers substrats pour se faire une représentation plus actuelle des mécanismes des fermentations butyrique et acétono-butylique.

a) *Glucose*. — Simon [92] rapporte que des suspensions lavées et des poudres acétoniques de *Cl. acetobutylicum* dégradent le glucose en donnant les acides butyrique et acétique dans la proportion  $B/A = 1,6/1$ . Le glucose-1-phosphate, dans les mêmes conditions fournit de bien moindres quantités d'acide butyrique ( $B/A = 1/2,5$ ) ; le rendement diminue encore si le substrat est le glucose-6-phosphate ( $B/A = 1/10$ ). Si l'on utilise le glucose-1,6-diphosphate, on ne trouve plus d'acides volatils, mais du méthylglyoxal et des traces d'acide pyruvique.

Davies [130 a], par contre, note que les suspensions lavées de *Cl. acetobutylicum* ne provoquent pas de dégagement de  $\text{CO}_2$  et de  $\text{H}_2$  à partir de glucose. Selon lui, les suspensions perdent leur activité durant les processus de centrifugation et de lavage. Elles reprennent leur activité si on les suspend dans le milieu de culture originel au lieu de tampon. En se servant de l'activité de cette suspension comme point de comparaison, Davies essaie d'étudier l'influence de divers constituants du milieu de culture sur la réactivation des suspensions lavées. Il retient comme milieu de resuspension pour ses expériences le milieu de base fraîchement bouilli additionné d'extrait de levure. La composition du milieu de base de Davies [130 a] a été guidée par le souci d'obtenir

à partir de glucose le même rendement en solvants neutres, acétone et butanol, qu'à partir de l'amidon de maïs. En effet, sur maïs, *Cl. acetobutylicum* donne environ 8,5 p. 100 d'acétone et 23,4 p. 100 de butanol sur la base de l'amidon fermenté ; par contre, sur glucose additionné d'extrait de levure, on obtient des résultats variables ; le rendement en solvants est souvent faible et la fermentation est « acide » ; parfois, la fermentation est presque normale. Davies retient comme milieu de base le milieu de McDaniel, Woolley et Peterson [130 b] (sels minéraux, asparagine à 0,1 p. 100 + digestion tryptique de caséine correspondant à 0,25 p. 100 de caséine) additionné de digestion tryptique de foie correspondant à 2,5 p. 100 de tissu hépatique frais. Dans ces conditions, on obtient d'une manière reproductible de bons rendements en solvants neutres.

b) *Modifications à la molécule de glucose.* — Selon Simon [92], les poudres acétoniques de *Cl. acetobutylicum* attaquent le mannitol, le dulcitol et le sorbitol en donnant les acides butyrique et acétique dans des proportions allant de B/A = 3/1 à 4/1. Les bactéries attaquent l'acide D-gluconique en donnant B/A = 1/5 à 1/3. L'acide D-galacturonique donne de l'acide acétique pur et l'acide saccharique B/A = 1/4.

c) *Pentoses.* — Les sucres naturels en C<sub>5</sub> (L-arabinose, D-xylose, L-rhamnose) sont fermentés. Le D-arabinose ne l'est pas, indiquant ainsi une spécificité stéréochimique. L'oxydation du groupement aldéhydique en carboxyle supprime la fermentabilité (acide arabinique), alors que sa réduction en hydroxyle n'affecte pas cette dernière (arabitol). Simon [92].

d) *Tétroses.* — Le DL-érythritol n'est pas attaqué. Simon [92].

e) *Composés en C<sub>3</sub> autres que le pyruvate et le lactate.* — L'acide-3-phosphoglycérique, son mélange en quantité équimoléculaire avec l'acide glycérophosphorique, le DL-glycéraldéhyde ne sont pas attaqués. Le glycérol est attaqué en donnant un mélange d'acides dans le rapport B/A = 2,5/1. Simon [92].

f) *Pyrurate.* — Dans la plupart des fermentations bactériennes, le pyruvate est admis comme étant un intermédiaire important. Toutefois, dans les fermentations butyrique et acétono-butylique, il y a de nombreux désaccords à ce sujet. Kluyver [124, 125] et Simon [91, 92] soutiennent que le pyruvate n'est pas un intermédiaire parce que ni acide butyrique ni butanol ne se forment en quantités appréciables à partir de ce corps sous l'influence de *Cl. acetobutylicum*. Johnson, Peterson et Fred [101], dans des expériences en culture, constatent que le même organisme ne donne pas plus de corps en C<sub>4</sub> si l'on ajoute du pyruvate au milieu fermentant vigoureusement le glucose. Ces auteurs pensent que vu le degré d'oxydation du pyruvate, on ne doit pas s'attendre à une formation substantielle de corps en C<sub>4</sub> à partir

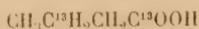
de ce substrat. Cependant Osburn, Brown et Werkman [100, 131] ont vu que dans la fermentation causée par *Cl. butylicum* (qui ne diffère de celle causée par *Cl. acetobutylicum* que par la production d'isopropanol au lieu d'acétone), le pyruvate est transformé en acide butyrique.

Il est peu vraisemblable que ces deux fermentations possèdent des mécanismes essentiellement différents. Les mêmes auteurs [100, 132] ont vu que si le pH de la fermentation par *Cl. butylicum* est maintenu à 7 par addition de bicarbonate, il s'accumule de grandes quantités de pyruvate.

Cohen et Cohen-Bazire [34, 35, 36] pensent que les divergences de la littérature proviennent du fait que les divers auteurs ont utilisé des souches différentes. Ainsi, ils ont pu observer que les suspensions de la souche GR<sub>4</sub> de *Cl. butyricum*, var. *saccharo-butyricum* donnent de l'acétate et du butyrate à partir de pyruvate ; il en a été de même avec la souche FD<sub>11</sub> de *Cl. acetobutylicum*, alors que les souches PC<sub>48</sub> et L<sub>41</sub> et quelques autres souches de la même espèce ne donnent que de l'acétate à partir de pyruvate. On retrouve dans le premier cas les résultats des expériences d'Osburn et al., dans le second, ceux des expériences de Kluyver et de Simon. Or, toutes les souches utilisées se comportent en culture comme des ferment butyriques ou acétonobutyliques normaux. Cohen et Cohen-Bazire [35, 36] appellent souches « déficientes » celles dont les suspensions sont incapables de fournir du butyrate à partir de pyruvate, les autres souches étant appelées « normales ». L'addition d'aneurine, de riboflavine, d'acide ou d'amide nicotinique, de pyridoxine, d'acide adénylique, d'ATP, de pantothéate + ATP, de diphosphopyridine-nucléotide, de coenzyme A et de coenzyme A + ATP n'a pas permis aux suspensions « déficientes » d'effectuer la transformation pyruvate → butyrate.

Les mêmes auteurs [34, 35, 36] ont étudié la dégradation du pyruvate par les suspensions de souches « normales » en fonction du temps. Au début, on ne trouve que de l'acide acétique, puis la quantité d'acide butyrique croît et le rapport butyrique/acétique atteint finalement des valeurs comprises entre 1/2 et 1/1. Ce résultat, quoique n'amenant pas la preuve formelle de la transformation d'acétate en butyrate, suggère fortement un tel mécanisme. A défaut d'admettre ce phénomène, il faudrait admettre l'existence de deux systèmes enzymatiques distincts, dont l'un ne commencerait à agir que quelques heures après l'autre, la vitesse de la réaction qu'il catalyse augmentant progressivement, alors que l'enzyme responsable de la formation d'acide acétique agirait de plus en plus lentement. Une telle interprétation, outre ce qu'elle présente de singulier, est en désaccord avec les résultats de Wood, Brown et Werkman [133] et de

Wood, Brown, Werkman et Stuckwish [134] selon lesquels l'addition d'acétate marqué avec du C<sup>13</sup> à des cultures de *Cl. butylicum* et de *Cl. acetobutylicum*, fermentant vigoureusement le glucose résulte en la formation de butyrate également marqué. Ces auteurs déduisent du fait que le butyrate obtenu dans leurs expériences est marqué en quantités sensiblement égales sur le carboxyle et en position  $\beta$  :

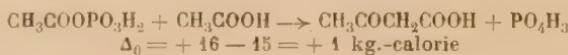


que le butyrate provient vraisemblablement d'une condensation de deux acétates ou de deux « composés en C<sub>2</sub> » plutôt que la condensation d'un acétate marqué avec un métabolite provenant de la dégradation du glucose. Examinons du point de vue thermodynamique les implications d'une telle réaction :



En effet, sans affirmer que telle est la réaction de condensation, les auteurs admettent qu'elle rendrait compte de leurs résultats de façon satisfaisante. Lipmann [97] fait valoir que le changement d'énergie libre d'une telle réaction est de + 16 kg-calories, ce qui est considérable, mais que -15 kg-calories peuvent être fournies si l'on remplace un des deux acétates par un acétylphosphate.

La réaction :



devient alors une réaction réversible. Rappelons que la réaction inverse, scission d'une molécule d'acétylacétate en molécule d'acétylphosphate et une molécule d'acétate est réalisée par *T. kluyveri* [44]. Le calcul montre donc qu'une énergie considérable est nécessaire pour lier deux molécules d'acétate avec une perte d'une molécule d'eau. Weinhouse, Medes et Floyd [135] ont montré qu'une telle réaction est liée dans les coupes de foie à l'occurrence simultanée d'énergie fournie par la respiration. Une telle énergie n'est pas fournie en anaérobiose. En outre, dans ces expériences, Weinhouse, Medes et Floyd ont montré qu'en présence d'acétate marqué sur le carboxyle avec du C<sup>13</sup>, l'acétylacétate présente une distribution *inégale* de C<sup>13</sup>, contrairement à ce qui se passe pour le butyrate dans les expériences de Wood et al. [133] : il apparaît moins de C<sup>13</sup> dans le groupe carbonyle, point de jonction entre le carboxyle actif de l'acétate marqué et le groupe méthyle d'un autre acétate, que dans le groupe carboxyle de l'acétylacétate, qui appartenait à l'origine à l'« autre » acétate. Ceci montre pour le moins, suivant

Weinhouse et al., que le métabolisme donne naissance plus facilement à des groupements acétyle actifs par les voies qui lui sont propres que par activation d'acétate ajouté de l'extérieur. Cohen et Cohen-Bazire [34, 35, 36] ont pensé que l'action de divers inhibiteurs sur la fermentescibilité du pyruvate par les suspensions de souches « normales » pourrait peut-être leur donner quelques indications sur le mécanisme de la formation de l'acide butyrique à partir de ce substrat.

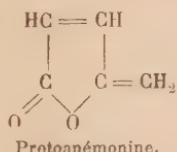
*Arsénite de sodium.* — Cohen-Bazire, Cohen, Nisman et Raynaud [36] ont montré que ce corps, à la concentration de  $10^{-3} M$ , réduit d'environ 30 p. 100 la consommation de pyruvate et la production d'acidité volatile par les suspensions « normales ». L'action remarquable de l'arsénite de sodium est d'inhiber totalement la production d'acide butyrique à partir de pyruvate, le seul acide volatile formé étant dans ces conditions l'acide acétique.

*Autres inhibiteurs* (Cohen et Cohen-Bazire).

*Fluorure de sodium.* — Cet inhibiteur ne modifie pas le rapport des deux acides. Il a une action inhibitrice sur l'acidité volatile qui varie de 8 à 57 p. 100 pour des concentrations de  $1,5 \times 10^{-2} M$  à  $3 \times 10^{-2} M$  suivant la densité des suspensions.

*Monofluoroacétate de sodium.* — Ce corps a été montré par Bartlett et Barron [37] produire une utilisation diminuée du pyruvate et une accumulation d'acétate, accompagnée d'une inhibition de la formation d'acétylacétate. Les auteurs présentent ces résultats comme indiquant que l'oxydation des acides gras passe par un stade acétate. Leurs expériences portent sur des coupes de cœur, de rein et de foie. Kalnitsky et Barron [38] ont ensuite montré que l'oxydation de l'acétate par la levure est inhibée par le fluoroacétate, ainsi que l'oxydation du pyruvate. L'inhibition est beaucoup moins marquée avec *E. coli* et *Coryneb. creatinovorans*. Dans nos expériences en anaérobiose effectuées avec une souche « normale », le monofluoroacétate à des concentrations de  $10^{-2} M$  et même de  $10^{-1} M$  n'a aucune action inhibitrice sur l'acidité volatile ou sur la production de l'acide butyrique.

*Protoanémonine.* — Des extraits d'*Anemone pulsatilla* montrent une action antibiotique marquée vis-à-vis d'organismes Gram-positifs, Gram-négatifs et acido-résistants [39]. Baer, Holden et Seegal [40] ont montré que l'agent responsable de cette action est la protoanémonine.



Holden, Seegal et Baer [41] ont montré que la protoanémonine

à des dilutions de 1/30.000 à 1/350.000 inhibe la croissance des anaérobies *Cl. histolyticum*, *Pl. tetani*, *Cl. novyi*, *W. perfringens*, *Cl. aerematiens*, *Cl. sporogenes*, ainsi que celle de nombreux aerobies. Enfin, Baer [142] montre que la protoanémonine inhibe la pyruvate oxydase de *Proteus vulgaris*.

Avec nos suspensions normales, nous avons trouvé avec une concentration en protoanémonine de  $2 \times 10^{-3}$  M une inhibition de 32 p. 100 de l'acidité volatile à partir de pyruvate. Avec une concentration double, l'inhibition était de 57 p. 100. La nature et les proportions relatives des acides restent inchangées.

*Pénicilline G*. — 5.000 et 10.000 unités Oxford de pénicilline G n'ont eu aucune action, qualitative ou quantitative, sur la dégradation du pyruvate par les suspensions normales.

*Analogues de l'acide pantothenique*. — Lipmann [143] a vu que des homogénats concentrés de foie de Pigeon acétylent vigoureusement les sulfamides, en particulier en présence d'acétate. L'acétylation était négligeable en absence de respiration, mais pouvait avoir lieu en anaérobiose en présence d'ATP. Lipmann et Kaplan [144] montrèrent que l'enzyme acétylant possède un coenzyme dialysable et que la même préparation est responsable de la phosphorylation de l'acétate dans le foie de Pigeon et de l'acétylation de la choline dans le cerveau. Kaplan et Lipmann [145] ont montré la simultanéité générale du couplage de l'ATP et du métabolisme de l'acétate dans l'acétylation. Lipmann, Kaplan, Novelli, Tuttle et Guirard [146] ont montré que le coenzyme A, coenzyme de l'enzyme acétylant, est un dérivé de l'acide pantothenique, inactif vis-à-vis du dosage microbiologique de l'acide pantothenique, mais qui libère la vitamine libre sous l'action combinée d'une phosphodiesterase et d'un enzyme du foie non identifié [147]. Kaplan et Lipmann [148], étudiant la répartition du coenzyme A, trouvent que c'est un constituant général des organismes vivants : les valeurs les plus élevées sont trouvées dans le foie, *Proteus morganii* et surtout *Cl. butylicum*. Cette dernière observation, en connexion avec le rôle observé du coenzyme A dans le métabolisme de l'acétate, suggère à ces auteurs une fonction du coenzyme A dans la condensation de résidus en C<sub>2</sub> en chaînes carbonées en C<sub>4</sub>.

Nous avons dès lors pensé qu'il serait intéressant de voir si des substances analogues de l'acide pantothenique inhibaient la formation de butyrate à partir de pyruvate en bloquant l'acétylation de l'acétate ou d'un autre catabolite. Nous avons donc fait fermenter le pyruvate par les suspensions de nos souches « normales » en présence de tels composés.

La pantoyletaurine, à des concentrations allant de  $2,5 \times 10^{-3}$  M à  $2,5 \times 10^{-2}$  M, n'a affecté ni la quantité d'acides formés, ni les proportions relatives des acides butyrique et acétique. Il en

a été de même avec le pantoysulfanilamide et le DL [(2-pantoylaminoo) éthylsulfone] 4-sulfamylanilide, à des concentrations allant de  $5 \times 10^{-3}$  M à  $1,5 \times 10^{-2}$  M.

Les résultats ont été tout différents avec le D-[(2-pantoylaminoo) éthylsulfone] 4-nitroanilide. Si l'on incube du pyruvate en présence de cet analogue à la concentration de  $5 \times 10^{-3}$  M, on obtient un mélange d'acides dans lequel la proportion relative d'acide butyrique a diminué d'environ 20 p. 100 par rapport au témoin sans inhibiteur. Pour une concentration de l'analogue de  $1,5 \times 10^{-2}$  M, cette diminution est de 50 p. 100. Enfin, si l'inhibiteur est employé à la concentration de  $3 \times 10^{-2}$  M, le pyruvate ne donne pratiquement naissance qu'à de l'acide acétique, la synthèse d'acide butyrique étant presque totalement supprimée.

Nous donnons ci-dessous les résultats d'une expérience qui n'a pu encore être répétée à ce jour en raison de la faible quantité d'analogues dont nous disposions :

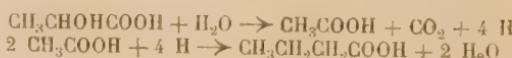
L'inhibition totale de la synthèse d'acide butyrique par les suspensions agissant sur le pyruvate, obtenue par action du D-[(2-pantoylaminoo)éthylsulfone] 4-nitroanilide à la concentration de  $3 \times 10^{-2}$  M est entièrement supprimée, si l'on fait agir en même temps que l'inhibiteur du coenzyme A à une concentration de  $3 \times 10^{-6}$  M (calculée d'après sa teneur en pantothéнат combiné). Une concentration de  $1,1 \times 10^{-4}$  M de pantothéнат libre ne lève que partiellement l'inhibition causée par l'analogue.

Il reste à expliquer pourquoi un seul des quatre analogues de l'acide pantothénique qui ont été essayés s'est montré inhiber l'acétylation impliquée dans la synthèse de l'acide butyrique. En effet, si nous transposons les vues de Kohn [149] et de Woods [150], selon lesquelles chez les germes sensibles aux sulfamides, ces inhibiteurs empêchent la transformation de l'acide *p*-aminobenzoïque en acide ptéroylglutamique, nous pouvons faire l'hypothèse que les analogues de l'acide pantothénique inhibent la croissance bactérienne en empêchant la transformation de l'acide pantothénique en coenzyme A.

Dès lors, les suspensions cellulaires contenant le coenzyme A préformé, leur activité vis-à-vis du pyruvate dans le cas qui nous concerne ne doit pas être affectée par les analogues utilisés. C'est ce qui se passe pour trois des analogues utilisés dans les expériences de Cohen et de Cohen-Bazire. L'action inhibitrice du D-[(2-pantoylaminoo)éthylsulfone] 4-nitroanilide est actuellement l'objet d'une étude plus approfondie.

g) *Lactate*. — Quoique la fermentation du lactate par les bactéries butyriques ait été étudiée par un grand nombre de bactériologistes (Pasteur [151], Beijerinck [152], Schattensfroh et Grassberger [153], Bredemann [154], Bokhout et Van Beynum [155]), son mécanisme est encore obscur. Van Beynum et Pette [156] ont

déerrit une fermentation naturelle du lactate et plusieurs chercheurs sont arrivés à obtenir des cultures par enrichissement de bactéries butyriques en utilisant le lactate comme constituant principal de leur milieu ; mais en culture pure, ces bactéries perdent leur capacité d'attaquer le lactate, quoiqu'elles soient toujours capables de croître sur des milieux à base de glucides. Cependant, Van Beynum et Pette [457] arrivèrent enfin à faire croître ces organismes dans un milieu à base de lactate, mais seulement en présence d'une grande quantité d'autolysat de levure, à un point tel qu'il n'est pas possible de décider si c'est le lactate ou l'autolysat de levure qui fournit la source principale d'énergie et de carbone. Van Beynum et Pette [457] affirment être dans l'impossibilité de savoir si la fermentation du lactate doit être considérée comme un phénomène autonome ou comme liée aux fermentations glucidiques. Bhat et Barker [458], ayant isolé des bactéries butyriques sur un milieu minéral additionné de lactate et d'autolysat de levure, observent sur ce milieu que la croissance est pratiquement proportionnelle à la quantité d'autolysat de levure jusqu'à 30 p. 100 de ce constituant. Des expériences préalables de Barker [5] et des résultats de Bornstein et Barker [6] effectués avec *T. kluyveri* avaient montré à ces auteurs qu'une dépendance de la croissance vis-à-vis de quantités anormalement élevées d'autolysat de levure pouvait représenter un besoin du germe en acétate, toujours présent en petites quantités dans l'autolysat de levure. Bhat et Barker [458], s'inspirant de ces résultats, réussirent à faire croître les bactéries qu'ils avaient isolées sur un milieu à base de lactate et d'acétate avec des quantités réduites d'autolysat de levure. Ils montrèrent que les cultures du germe *Cl. lacto-acetophilum* ne décomposent le lactate qu'en fonction de l'acétate fourni. Ils vérifièrent que l'acétate est également décomposé et étudièrent l'influence de la concentration en acétate sur l'utilisation de l'acétate et la formation du butyrate. Leurs bilans sont représentés d'une manière satisfaisante par les équations suivantes :



Bhat et Barker montrent qu'il est impossible d'utiliser plus d'une mole de lactate et d'une mole d'acétate pour obtenir une mole de butyrate. Cohen et Cohen-Bazire [459] ayant vu que les suspensions de toutes leurs souches « normales » ou « déficientes » donnent, à partir de pyruvate, du lactate et de l'acétate, ont pensé qu'il serait intéressant de voir si, à partir de ces deux substrats incubés simultanément avec des suspensions lavées, on obtiendrait les résultats analogues à ceux de Bhat et Barker [458].

avec les cultures de *Cl. lactic-acetophilum*. En d'autres termes :

1° Le lactate seul est-il fermenté par les suspensions ?

2° L'est-il en présence d'acétate ? Dans ce dernier cas, y a-t-il une différence de comportement entre les suspensions « normales » et « déficientes » vis-à-vis de cette réaction particulière ?

Cohen et Cohen-Bazire ont tout d'abord remarqué la non-fermentescibilité du lactate par toutes les suspensions. Il n'apparaît pas d'acides volatils et on retrouve tout le lactate. Les suspensions « déficientes » ne produisent pas de butyrate en présence simultanée de lactate et d'acétate. Ici encore, le lactate n'est pas métabolisé. Par contre, les suspensions « normales » produisent des quantités importantes de butyrate dans ces conditions ; il apparaît une mole au maximum de butyrate par mole d'acétate disparu et le lactate est consommé au cours de cette transformation. Les bilans concordent avec l'équation globale donnée par Bhat et Barker [458] dans leurs expériences en culture. Il est net, d'après ces résultats, que les suspensions « normales » utilisent l'acétate pour la synthèse du butyrate, ce qui est encore en accord avec les résultats de Wood, Brown et Werkman [433] et rend certaine l'interprétation de Cohen et Cohen-Bazire [36] relative à leurs expériences de fermentation du pyruvate en fonction du temps.

La question se pose maintenant de savoir, puisque toutes les souches donnent à partir du pyruvate à la fois du lactate et de l'acétate, si ces deux substrats sont ou non des intermédiaires réels, dans la production de l'acide butyrique par les suspensions « normales » agissant sur le pyruvate. En faveur de cette thèse, est le fait que les suspensions « déficientes » vis-à-vis du pyruvate le sont aussi vis-à-vis de la réaction lactate-acétate. Dans ce cas, la formation de butyrate à partir du couple lactate-acétate doit être soumise à des variations parallèles sous l'influence des inhibiteurs à celles observées à partir de pyruvate.

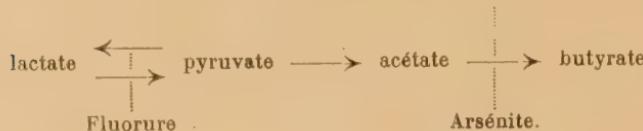
*Arsénite de sodium.* — A la concentration de  $10^{-3}$  M, il réalise une inhibition totale de la production de butyrate par les suspensions « normales » à partir du couple lactate-acétate, réalisant ainsi une action analogue à la disjonction entre la production de l'acétate et sa condensation en corps en  $C_4$ , observée dans le cas du pyruvate.

*Fluorure de sodium.* — Le comportement des fermentations pyruvique et lactique-acétique est absolument différent vis-à-vis de cet inhibiteur. Rappelons que le fluorure réduit la quantité globale d'acides formée à partir de pyruvate, sans toutefois modifier la nature et le rapport des acides. Le même inhibiteur aux mêmes concentrations empêche par contre la synthèse de butyrate à partir du couple lactate-acétate. On pourrait en conclure que le passage par le lactate n'est en tout état de cause pas la voie prin-

cipale vers le butyrate et qu'il ne représente qu'une fraction dans la formation de ce dernier, même en l'absence de fluorure, puisqu'en présence de ce dernier, le pyruvate est fermenté comme en son absence.

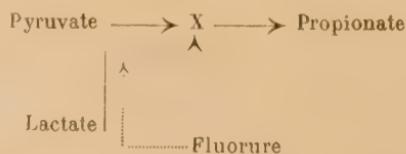
Toutefois, le lactate et l'acétate se formant à partir de pyruvate, il n'y a aucune raison de douter que la réaction entre le lactate et l'acétate ne puisse avoir lieu dans une certaine mesure, représentant une deuxième voie de formation pour l'acide butyrique.

Ces faits peuvent être représentés par le schéma ci-dessous :



Pour satisfaire aux données expérimentales, il faut se souvenir que dans ce schéma, l'oxydation du lactate est obligatoirement liée à une réduction de l'acétate. Notons encore que si le fluorure empêche le lactate d'être déshydrogéné, il ne diminue pas du tout la réduction inverse du pyruvate en lactate.

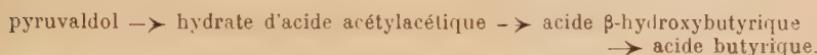
Sans vouloir trancher pour l'instant cette question délicate, rappelons un fait analogue découvert par Barker et Lipmann [418] avec *Propionibacterium pentosaceum*. Les suspensions de cet organisme fermentent le lactate seul, de même que le pyruvate. Sur la base des vitesses différentes des fermentations de ces deux composés et de leurs susceptibilités différentes au fluorure, les auteurs proposent le schéma suivant :



dans lequel ils admettent l'existence d'un intermédiaire inconnu commun aux deux mécanismes.

h)  $\beta$ -hydroxybutyrate. Schoen [460] avait émis l'hypothèse que le  $\beta$ -hydroxybutyrate était un intermédiaire possible de la fermentation acétono-butylique. Ce point de vue avait été rejeté par Johnson, Peterson et Fred [401] sur la base d'expériences en culture avec *C. acetobutylicum*, où le  $\beta$ -hydroxybutyrate, ajouté à des cultures fermentant vigoureusement le glucose, ne provoquait pas l'accroissement de la formation d'acétone ou de corps en  $C_4$ . Ils ont également essayé d'isoler le  $\beta$ -hydroxybutyrate à partir de cultures fermentant le glucose sans y parvenir.

Peldan [96] dans le cadre de sa théorie du pyruvaldol propose comme schéma de la formation d'acide butyrique :



Cependant, Peldan n'amène aucune preuve expérimentale à l'appui de son hypothèse ; d'autre part, dans son schéma, le  $\beta$ -hydroxybutyrate ne donne que du butyrate comme acide volatil. Nous reviendrons sur ce point. Davies [161] ne note aucun échange gazeux par la technique de Warburg en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate et de suspensions de *Cl. acetobutylicum*. Il ne recherche pas s'il s'est formé des acides volatils.

Si nous examinons donc la littérature relativement restreinte relative à la fermentation du  $\beta$ -hydroxybutyrate, nous voyons qu'il n'a pas été décrit d'expériences où des acides volatils aient été recherchés après incubation de ce substrat avec des suspensions lavées. Cohen et Cohen-Bazire [34, 35, 116 b] ont réalisé cette expérience avec des suspensions « normales » et des suspensions « déficientes ». Toutes se sont montrées donner les acides butyrique et acétique à partir de  $\beta$ -hydroxybutyrate, en même temps que de faibles quantités d'acétone.

La fermentation du  $\beta$ -hydroxybutyrate s'est montrée relativement sensible à l'action de l'arsénite, sans toutefois que la nature et le rapport des acides volatils formés soient affectés ; seule, la quantité d'acides est fortement réduite. Le fluorure produit des effets semblables. Les proportions de butyrate formé à partir de  $\beta$ -hydroxybutyrate varient entre 33 et 50 p. 100 de l'acidité volatile totale. Il est inutile d'ajouter un donneur d'hydrogène : il est évident que le  $\beta$ -hydroxybutyrate joue à la fois le rôle d'un tel donneur et de générateur du corps accepteur d'hydrogène.

Cohen et Cohen-Bazire [116 b] proposent le schéma partiel suivant :

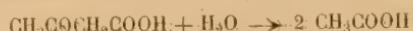


Nous allons voir ce que devient la deuxième molécule d'acétylacétate.

i) *Acétylacétate*. — Tous les auteurs admettent que l'acétylacétate est un intermédiaire dans la formation de l'acétone par les bactéries acétono-butyliques. Johnson, Peterson et Fred [101] l'ont montré avec des suspensions lavées de *Cl. acetobutylicum*. Davies [161] a étudié les caractéristiques de l'enzyme responsable de la décarboxylation de l'acétylacétate par le même organisme.

On ne trouve pas dans la littérature, en ce qui concerne les bactéries acétono-butyliques ou butyriques, de formation d'acides volatils à partir de l'acétylacétate. Lehninger [115] note le pre-

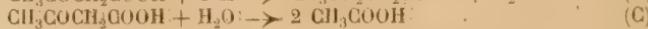
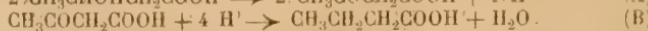
mier avec *E. coli* une scission hydrolytique enzymatique de l'acétylacétate en deux molécules d'acétate selon :



Stadtman et Barker [44] décrivent une hydrolyse phosphoroclastique analogue, avec *T. kluyveri* :



Le fait que toutes les souches, « normales » ou « déficientes », utilisées par Cohen et Cohen-Bazire [34, 35, 44 b] donnent du butyrate et de l'acétate à partir de  $\beta$ -hydroxybutyrate a incité ces auteurs à chercher si cet acétate ne pouvait pas provenir de la formation intermédiaire d'acétylacétate selon le schéma suivant, complétant celui que l'on a vu à la fin de la section  $\beta$ -hydroxybutyrate :



La réaction globale (A) + (B) + (C) serait alors :



et correspondrait en gros aux bilans expérimentaux observés par Cohen et Cohen-Bazire à partir du  $\beta$ -hydroxybutyrate.

Si cette hypothèse est exacte, on doit trouver avec les suspensions de toutes les souches utilisées une hydrolyse de l'acide acétylacétique en acide acétique ; on doit pouvoir également trouver des corps qui réduisent l'acétylacétate en butyrate.

La première de ces conséquences a été expérimentalement vérifiée par Cohen et Cohen-Bazire [35, 44 a, 44 b] avec toutes leurs souches. Les suspensions « déficientes » hydrolysent quantitativement l'acide acétylacétique en acide acétique. Les suspensions « normales » produisent à partir de l'acétylacétate, outre l'acide acétique, une proportion notable d'acide butyrique, ce qui montre l'existence dans ces suspensions de donneurs d'hydrogène intracellulaires. Ces donneurs ne sont d'ailleurs pas générateurs d'acides volatils par eux-mêmes, les suspensions seules donnant des valeurs d'acidité négligeables.

Le fait que les suspensions « normales » réduisent partiellement l'acétylacétate donne à penser qu'en présence d'un substrat réducteur approprié l'acétylacétate peut donner naissance à des quantités importantes de butyrate. Il est peu vraisemblable que le donneur endogène soit le pyruvate, auquel cas les suspensions seules donneraient une acidité appréciable. Cohen et Cohen-Bazire [44 a, 44 b] ont alors essayé le lactate qui, seul, n'est pas fermenté [45]. Ici encore, la différence entre suspen-

sions « normales » et « déficientes » subsiste : le lactate ne réduit l'acétylacétate qu'avec les suspensions normales ; le rendement en acide butyrique, qui est de 27 à 36 p. 100 de l'acidité volatile totale avec l'acétylacétate seul, devient en présence de lactate et d'acétylacétate égal à 59 à 66 p. 100 de cette acidité.

On peut envisager soit une réduction directe de l'acétylacétate, soit une hydrolyse préalable de l'acétylacétate en acétate suivie d'une formation de butyrate à partir du couple lactate-acétate, réaction réalisable par les suspensions « normales », comme les mêmes auteurs l'ont montré par ailleurs [459]. Les bilans des expériences montrent qu'il s'agit principalement d'une réduction directe de l'acétylacétate en butyrate. En effet, si l'acétylacétate était préalablement hydrolysé, il donnerait deux molécules d'acétate par molécule. Pour des quantités constantes de lactate on devrait obtenir moins de butyrate en présence d'acétylacétate qu'en présence d'acétate. Or, alors que le couple lactate-acétate fournit un mélange d'acides acétique et butyrique dans lequel la proportion d'acide butyrique varie de 33 à 50 p. 100 [459], le couple lactate acétylacétate produit de 59 à 66 p. 100 de butyrate.

Les expériences de Cohen et Cohen-Bazire [416 a, 416 b] laissent entendre que l'acétylacétate est non seulement un intermédiaire dans la formation de l'acétone, mais aussi dans celle des corps en C<sub>4</sub> de la fermentation acétono-butylique. Ceci est en accord avec les résultats de Wood, Brown et Werkman [133] qui, ajoutant à des cultures fermentant le glucose de l'acétate, marqué avec du C<sup>14</sup> sur le carboxyle retrouvent le butyrate marqué en quantités égales sur le carboxyle et en position  $\beta$ .

Poursuivant leurs études avec le lactate, Cohen et Cohen-Bazire [416 b] ont vu que la proportion de butyrate qui atteint 50 p. 100 en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate seul peut être amenée à 80 p. 100 si le lactate et le  $\beta$ -hydroxybutyrate sont incubés simultanément. Ici encore la donation d'hydrogène par le lactate n'est réalisée que par les souches « normales » : Comme dans le cas du couple lactate-acétate, la donation d'H<sub>2</sub> à partir du lactate est supprimée en présence de fluorure pour les couples lactate-acétylacétate et lactate- $\beta$ -hydroxybutyrate.

#### MÉCANISME DE LA PRODUCTION D'ACIDE BUTYRIQUE A PARTIR DE PYRUVATE.

Si nous résumons ce long chapitre relatif à la fermentation butyrique nous nous trouvons en présence de faits qui peuvent s'exprimer par la suite de réactions ci-dessous :

A. —



B. — Du point de vue thermodynamique, on peut admettre avec Lipmann [97] que la transformation de l'acétate en acétylacétate se fasse selon :

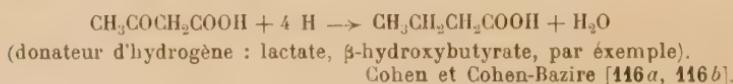


Cette réaction est la réaction inverse de celle découverte par Stadtman et Barker [114] avec un extrait de *T. kluyveri*. Les résultats de Cohen et Cohen-Bazire sur la formation de butyrate à partir d'acétylacétate rendent probable une telle réaction intermédiaire.

C'est cette réaction qui est vraisemblablement inhibée par le D-[2-pantoylamo] éthylsulfone, 4-nitroanilide et qui nécessite le coenzyme A [36].

Ce point de vue est légitimé en outre par les expériences de Soodak et Lipmann [162] qui ont montré que la synthèse enzymatique d'acétylacétate à partir d'acétate + ATP dans les extraits de foie de Pigeon est dépendante de la présence de coenzyme A.

C. —



D. — La somme des réactions B et C donne :



Cohen et Cohen-Bazire [34] avaient obtenu des résultats négatifs en incubant de l'acétate avec des suspensions de bactéries butyriques en atmosphère d'hydrogène. Stadtman et Barker (communication personnelle), en incubant des extraits de *T. kluyveri* avec de l'acétylphosphate en présence d'hydrogène, ont vu se former d'importantes quantités de butyrate et de *n*-caproate, ce qui semble légitimer l'équation D.

V. ACIDES *n*-VALÉRIANIQUE, *n*-CAPROIQUE, *n*-HEPTANOIQUE. — Barker [163, 164] a montré que si l'on fait agir *Methanobacterium omelianskii*, organisme producteur de méthane, sur l'éthanol, l'acide acétique est le seul produit d'oxydation. Mais avec des cultures par enrichissement sur des milieux à base d'éthanol, il arrive souvent que l'acide acétique ne se forme qu'en petites quantités et que la plus grande partie de l'éthanol soit transformée en acides *n*-caproïque et butyrique (Barker [165]). Dans certaines cultures, il arrive que 75 p. 100 en poids des acides volatils soit de l'acide *n*-caproïque. L'examen microscopique de ces cultures montre qu'à côté de *Mb. omelianskii*, on trouve une grande bactérie, mobile et sporulée. Barker et Taha [3] ont isolé

cet organisme en culture pure et lui ont donné le nom de *Cl. kluyveri*. Selon Prévot [50], il faut préférer le nom de *Terminosporus kluyveri*. Les auteurs en isolèrent neuf souches et décrivirent les caractéristiques morphologiques, physiologiques et nutritionnelles du nouvel organisme. Il ne croît pas sur lait, peptone, tryptone ou glucose. Une bonne croissance n'est obtenue que sur des milieux contenant des concentrations très fortes d'autolysat de levure et de l'éthanol. L'addition à ce milieu de peptone, de tryptone ou de glucose n'a aucun effet favorisant. Du point de vue diagnostique, il est important de noter la faible production d'ammoniaque. La réaction métabolique caractéristique du germe, jamais rencontrée auparavant avec un autre organisme, est la transformation de l'éthanol en acide *n*-caproïque. Bornstein et Barker [6] ont montré que *T. kluyveri* croît très bien sur un milieu synthétique à base de sels minéraux, d'éthanol, acétate, biotine et acide *p*-aminobenzoïque. L'autolysat de levure peut donc être totalement remplacé par la biotine, l'acide *p*-aminobenzoïque et l'acétate qu'il contient toujours. Aucun composé n'a pu remplacer l'éthanol. L'acétate peut être remplacé par le propionate et moins bien par le butyrate. Le *n*-valérianate ne peut pas être utilisé pour la croissance; quoique des expériences métaboliques aient montré à Bornstein et Barker [7] qu'il peut être utilisé à un faible degré à la place de l'acétate. L'organisme n'attaque ni le glucose, ni le pyruvate, ni aucun autre des substrats habituels de la fermentation. Il y a une consommation de  $\text{CO}_2$  durant la croissance, dont la plus grande partie est utilisée pour la synthèse des constituants cellulaires. Dans des expériences en culture effectuées avec de l'acétate marqué sur le carboxyle avec du  $\text{C}^{14}$ , Barker, Kamen et Bornstein [4] ont montré que le butyrate et le caproate formés sont marqués. Comme dans les expériences de Wood, Brown et Werkman, l'acide butyrique a son  $\text{C}^{14}$  à peu près également distribué sur le carboxyle et sur le carbone en  $\beta$ , les positions  $\alpha$  et  $\gamma$  étant inactives. L'acide caproïque a un tiers de son  $\text{C}^{14}$  dans le groupe carboxyle; il est probable que les positions  $\beta$  et  $\delta$  sont également marquées, quoique cela n'ait point été prouvé. Il ne se forme pas de  $\text{CO}_2$  actif, ce qui indique que  $\text{CO}_2$  n'est pas un intermédiaire dans la synthèse des acides butyrique et caproïque. La teneur en  $\text{C}^{14}$  de l'acide acétique résiduel est bien moindre que celle de l'acide acétique initial. Ceci résulte évidemment d'une oxydation de l'éthanol en acide acétique ou en un composé similaire en équilibre isotopique avec lui.

Si, maintenant, l'on fait croître *T. kluyveri* sur l'éthanol ordinaire et du butyrate marqué sur le carboxyle, on trouve  $\text{C}^{14}$  dans l'acide caproïque, mais non dans l'acide acétique. L'acide caproïque ainsi formé ne contient pratiquement pas de  $\text{C}^{14}$  dans

son groupe carboxyle. Les auteurs en concluent que la formation de l'acide butyrique implique une condensation entre l'acide acétique ou l'acetylphosphate formé par l'oxydation anaérobie de l'éthanol et une deuxième molécule d'acide acétique. Le produit de la condensation est alors réduit en acide butyrique. L'acide caproïque se formerait à son tour par condensation du groupe carboxyle de l'acide butyrique ou du butyrylphosphate avec le groupe méthyle de l'acide acétique.

Nous avons déjà vu que cette théorie s'est avérée exacte, puisque Stadtman et Barker viennent de montrer que des extraits de *T. kluyveri* sont capables, en présence d'hydrogène, de donner de grandes quantités de butyrate et de *n*-caproate à partir d'acetylphosphate.

Enfin, Bornstein et Barker [7] ont montré que *T. kluyveri* transforme l'éthanol et l'acétate plus ou moins quantitativement en *n*-butyrate, *n*-caproate et  $H_2$ ; si l'on remplace l'acétate par le propionate, on obtient un mélange d'acétate, *n*-butyrate, *n*-valérianate, *n*-caproate, *n*-heptanoate et  $H_2$ . Il ne se forme pas de  $CO_2$ . Des arguments sont donnés en faveur de la thèse selon laquelle ces fermentations sont des processus d'oxydo-réduction au cours desquels l'éthanol est oxydé en acide acétique et les acides gras homologues formés par des réactions successives de condensation et de réduction. Les données thermodynamiques indiquent que ces réactions sont exergoniques et d'ailleurs les expériences de croissance ont montré qu'elles sont suffisantes pour assurer les besoins énergétiques des bactéries.

Les expériences du groupe de Werkman et du groupe de Barker sur la répartition du carbone marqué dans la molécule de butyrate et de caproate semblent exclure la possibilité d'une acétylation du pyruvate ou d'un autre corps en  $C_3$  (lactate par exemple), pour donner des corps intermédiaires tels que l'acetyl-pyruvate ou l' $\alpha$ -céto- $\gamma$ -hydroxyvalérianate, qui pourraient, par décarboxylation, donner de l'acetylacétate ou du  $\beta$ -hydroxybutyrate, qui sont, comme l'ont montré Cohen et Cohen-Bazire, des générateurs possibles de butyrate.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] PRÉVOT (A.-R.) et TAFFANEL (J.). *Ann. Ferment.*, 1942, **7**, 65.
- [2] PRÉVOT (A.-R.) et ZIMMÈS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 110.
- [3] BARKER (H. A.) et TADA (S. M.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 347.
- [4] BARKER (H. A.), KAMEN (M. D.) et BORNSTEIN (B. T.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1945, **31**, 373.
- [5] BARKER (H. A.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1947, **12**, 167.
- [6] BORNSTEIN (B. T.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 223.
- [7] BORNSTEIN (B. T.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **172**, 659.

- [8] BRASCH (W.). *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **48**, 380 ; *Ibid.*, 1909, **22**, 403.
- [9] WOODS (D. D.) et CLIFTON (C. E.). *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1774.
- [10] STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1935, **29**, 288.
- [11] WOODS (D. D.). *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1934.
- [12] HOOGERHEIDE (J. C.) et KOCHOLATY (W.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 949.
- [13] BESSEY (O. A.) et KING (C. G.). *J. Infect. Dis.*, 1934, **54**, 123.
- [14] WOODS (D. D.) et TRIM (A. R.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 501.
- [15] CLIFTON (C. E.). *J. Bact.*, 1942, **44**, 179.
- [16] a) CLIFTON (C. E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1939, **40**, 338 ; b) CLIFTON (C. E.). *J. Bact.*, 1940, **39**, 485.
- [17] PRÉVOT (A.-R.), COHEN (G. N.) et NISMAN (B.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 834.
- [18] NISMAN (B.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 323.
- [19] NISMAN (B.). *Thèse*, Paris, 1947.
- [20] NISMAN (B.) et THOUVENOT (M.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 310.
- [21] CARDON (B. P.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1942, **51**, 267.
- [22] CARDON (B. P.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 629.
- [23] CARDON (B. P.) et BARKER (H. A.). *Arch. Biochem.*, 1947, **12**, 165.
- [24] BARKER (H. A.), VOLCANI (B. E.) et CARDON (B. P.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 803.
- [25] PICKETT (M. J.). *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, 203.
- [26] CHARGAFF (E.) et SPRINSON (D. B.). *J. Biol. Chem.*, 1943, **148**, 249.
- [27] CHARGAFF (E.) et SPRINSON (D. B.). *J. Biol. Chem.*, 1943, **151**, 273.
- [28] CLIFTON (C. E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1940, **43**, 588.
- [29] COHEN (G. N.), NISMAN (B.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1948, **30**, 109.
- [30] BARKER (H. A.) et WIKEN (T.). *Arch. Biochem.*, 1948, **17**, 149.
- [31] ELDSEN (S. R.). *Biochem. J.*, 1946, **40**, 252.
- [32] SCHMIDT (E. G.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. Biol. Chem.*, 1924, **61**, 163.
- [33] COHEN-BAZIRE (G.) et COHEN (G. N.). *Biochem. J.*, 1949, **45**, 41.
- [34] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Nature*, London, 1948, **162**, 578.
- [35] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *VIII<sup>e</sup> Congrès de Chimie biologique*, Paris, 1948. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 374.
- [36] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.), *Ces Annales*, 1949 (sous presse).
- [37] WOODS (D. D.) et CLIFTON (C. E.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 345.
- [38] BARKER (H. A.). *Enzymologia*, 1937, **2**, 175.
- [39] BARKER (H. A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1939, **10**, 376.
- [40] JANKE (A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1930, **1**, 304.
- [41] RHEIN (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **84**, 561.
- [41 a] RHEIN (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **87**, 175.
- [42] PRÉVOT (A.-R.) et SAISSAC (R.). *Ces Annales*, 1947, **73**, 1125.
- [43] EDLBACHER (S.) et KRAUS (I.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1930, **191**, 225.
- [44] STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1935, **29**, 889.
- [45] NEUBERG (C.). *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **37**, 490.

- [46] ACKERMANN (D.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1907, **54**, 1 ; 1908, **56**, 305 ; 1909, **60**, 482 ; 1910, **64**, 91.
- [47] KOCHOLATTY (W.) et HOOGERHEIDE (J. C.). *Biochem. J.*, 1938, **32**, 437.
- [48] COHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G. N.) et PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **226**, 1143.
- [49] COHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G. N.) et PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 291.
- [50] PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des Bactéries anaérobies*, 2<sup>e</sup> édition, Masson, éditeur, Paris, 1948, 180.
- [51] NEUBERG (C.) et KARZAG (L.). *Biochem. Zeitschr.*, 1909, **18**, 435.
- [51 a] NEUBERG (C.) et ROSENBERG (E.). *Biochem. Zeitschr.*, 1907, **7**, 178.
- [51 b] NEUBERG (C.). *Biochem. Zeitschr.*, 1911, **37**, 501.
- [52] SABETAY (S.) et PANOUSE (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 887.
- [53] QUEBEDEAUX (W. A.), WASH (G.), NEY (W. O.), CROUCH (W. W.) et LOCHTE (H. L.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 767.
- [54] WAGNER (E.), MEYER (K. F.) et DOZIER (C. C.). *J. Bact.*, 1925, **10**, 321.
- [55] NISMAN (B.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.). *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 473.
- [56] NISMAN (B.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.). *Ces Annales*, 1948, **74**, 323.
- [57] RAYNAUD (M.) et MACHEBOËUF (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 694.
- [58] SAISSAC (R.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 305.
- [58 a] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 380.
- [58 b] ROSENBERG (A. J.) et NISMAN (B.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1949, **3**, 348.
- [58 c] NISMAN (B.) et VINET (G.). *Ces Annales*, 1949, **77**, 277.
- [58 d] NISMAN (B.) et VINET (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **229**, séance du 3 octobre.
- [59] BARKER (H. A.) et BECK (J. V.). *J. Biol. Chem.*, 1941, **141**, 3.
- [60] BARKER (H. A.) et BECK (J. V.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 291.
- [61] BARKER (H. A.) et PETERSON (W. H.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 307.
- [62] BARKER (H. A.), RUBEN (S.) et BECK (J. V.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1940, **26**, 477.
- [63] BARKER (H. A.) et ELSDEN (S. R.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 619.
- [64] SONNE (J. C.), BUCHANAN (J. M.) et DELLUVA (A. M.). *J. Biol. Chem.*, 1946, **166**, 395.
- [65] KARLSSON (J. L.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 597.
- [66] SONNE (J. C.), BUCHANAN (J. M.) et DELLUVA (A. M.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 69.
- [67] BUCHANAN (J. M.), SONNE (J. C.) et DELLUVA (A. M.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 81.
- [68] JUNGANO et DISTASO. *Les Anaérobies*, 1 vol., 1910.
- [69] PRINGSHEIM (H.). *Zeitschr. physiol. Chem.*, 1910, **78**, 268.
- [70] PRINGSHEIM (H.). *Zentralbl. Bakt.*, 1913, **38**, 513.

- [71] WERKMAN (C. H.) et STRITAR. *J. Bact.*, 1932, **23**, 71.
- [72] POCHON (J.). *Ces Annales*, 1935, **55**, 675.
- [73] MEYER (R.). *Arch. Mikrobiol.*, 1936, **5**, 185.
- [74] PRÉVOT (A.-R.) et VEILLON (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 451.
- [75] PRÉVOT (A.-R.) et VEILLON (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 249.
- [76] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **133**, 384.
- [77] PRÉVOT (A.-R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 103, 105.
- [78] PRÉVOT (A.-R.) et LOTH (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 457.
- [79] PRÉVOT (A.-R.) et LOTH (R.). *Ces Annales*, 1941, **67**, 244.
- [80] PRÉVOT (A.-R.) et LOTH (R.). *Ann. Ferment.*, 1941, **6**, 76.
- [81] KOEPSELL (H. J.) et JOHNSON (M. J.). *J. Biol. Chem.*, 1942, **145**, 379.
- [82] FONTAINE (F. E.), PETERSON (W. H.), MCCOY (E.), JOHNSON (M. J.) et RITTER (G. J.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 701.
- [83] BARKER (H. A.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1944, **30**, 88.
- [84] WIERINGA (K. T.). *Antonie van Leeuwenhœk*, 1936, **3**, 1.
- [85] WIERINGA (K. T.). *Antonie van Leeuwenhœk*, 1939-1940, **6**, 251.
- [86] BARKER (H. A.) et KAMEN (M. D.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1945, **31**, 219.
- [87] BARKER (H. A.) et HAAS (V.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 301.
- [88] BARKER (H. A.), KAMEN (M. D.) et HAAS (V.). *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 1945, **31**, 355.
- [89] CLIFTON (C. E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a: Med.*, 1940, **43**, 585.
- [90] KOEPSELL (H. J.), JOHNSON (M. J.) et MEEK (J. S.). *J. Biol. Chem.*, 1944, **154**, 535.
- [91] SIMON (E.). *Nature*, London, 1943, **152**, 626.
- [92] SIMON (E.). *Arch. Biochem.*, 1947, **14**, 39.
- [93] PELDAN (H.). *Suomen Kemistilehti B*, 1937, **10**, 8.
- [94] PELDAN (H.). *Suomen Kemistilehti B*, 1937, **10**, 13.
- [95] PELDAN (H.). *Suomen Kemistilehti B*, 1938, **11**, 5.
- [96] PELDAN (H.). *Biochem. Zeitschr.*, 1941, **309**, 108.
- [97] LIPPMANN (F.). *Adv. Enzymol.*, 1946, **6**, 231.
- [98] STONE (R. W.) et WERKMAN (C. H.). *Biochem. J.*, 1937, **31**, 1516.
- [99] PETT (L. B.) et WYNNE (A. M.). *J. Biol. Chem.*, 1932, **97**, 177.
- [100] OSBURN (O. L.), BROWN (R. W.) et WERKMAN (C. H.). *J. Biol. Chem.*, 1937, **121**, 685.
- [101] JOHNSON (M. J.), PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *J. Biol. Chem.*, 1933, **101**, 145.
- [102] LERNER (E. M.) et PICKETT (M. J.). *Arch. Biochém.*, 1945, **8**, 183.
- [103] BOORMA (H. J.), PRÉVOT (A.-R.) et VEILLON (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **131**, 1137.
- [104] JANKE (A.) et SIEDLER (V.). *Biochem. Zeitschr.*, 1937, **292**, 101.
- [105] SIMON (E.) et WEIZMANN (C.). *Enzymologia*, 1937, **4**, 169.
- [106] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1948, **227**, 873.
- [107] CONSDEN (R.), GORDON (A. H.) et MARTIN (A. J. P.). *Biochem. J.*, 1944, **38**, 244.
- [108] COHEN (G. N.), COHEN-BAZIRE (G.), RAYNAUD (M.) et NISMAN (B.). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 644.
- [109] VAUGHN (R. H.) et MARSH (G. L.). *J. Bact.*, 1943, **45**, 35.
- [110] VAUGHN (R. H.) et MARSH (G. L.). *Wines and Vines*, 1943, **24**, n° 11, 26.

[111] VAUGHN (R. H.), MARSH (G. L.), STADTMAN (T. C.) et CANTINO (B. C.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 311.

[112] PASTEUR (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1863, **56**, 416.

[113] TABACHNIK (J.) et VAUGHN (R. H.). *J. Bact.*, 1948, **56**, 435.

[114] STADTMAN (E. R.) et BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 1039.

[115] LEHNINGER (A. L.). *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 147.

[116] a] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *C. R. Acad. Sci.*, 1949, **228**, 1531.

[116] b] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Ces Annales*, 1949 (sous presse).

[117] JOHNS (A. T.). *Proceed. Biochem. Soc.*, 1948, **42**, II-III.

[118] BARKER (H. A.) et LIPMANN (F.). *Arch. Biochem.*, 1944, **4**, 361.

[119] WOOD (H. G.), WERKMAN (C. H.), HEMINGWAY (A.) et NIER (A. O.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1941, **46**, 313.

[120] WERKMAN (C. H.) et WOOD (H. G.). *Adv. Enzymol.*, 1942, **2**, 135.

[121] WOOD (H. G.). *Physiol. Rev.*, 1946, **26**, 198.

[122] PASTEUR (L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1861, **52**, 344.

[123] NEUBERG (C.) et ARINSTEIN (B.). *Biochem. Zeitschr.*, 1921, **47**, 269.

[124] KLUYVER (A. J.). *The chemical activities of microorganisms*. London, 1931.

[125] KLUYVER (A. J.). *Ergeb. Enzymforsch.*, 1935, **4**, 230.

[126] FITZ (A.). *Ber.*, 1876, **9**, 1348.

[127] DONKER (H. J. L.). *Thesis. Technische Hoogeschool*, Delft, 1926.

[128] VAN DER LEK (J. B.). *Thesis. Technische Hoogeschool*, Delft, 1930.

[129] BERNHAUER (K.) et KÜRSCHNER (K.). *Biochem. Zeitschr.*, 1935, **280**, 379.

[130] PETERSON (W. H.) et FRED (E. B.). *Ind. Eng. Chem.*, 1932, **24**, 237.

[130] a] DAVIES (R.) et STEPHENSON (M.). *Biochem. J.*, 1941, **35**, 1320.

[130] b] McDANIEL (L. E.), WOOLLEY (D. W.) et PETERSON (W. H.). *J. Bact.*, 1939, **37**, 259.

[131] OSBURN (O. L.), BROWN (R. W.) et WERKMAN (C. H.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1937, **36**, 203.

[132] OSBURN (O. L.), BROWN (R. W.) et WERKMAN (C. H.). *Iowa State Coll. J. Sci.*, 1938, **42**, 275.

[133] WOOD (H. G.), BROWN (R. W.) et WERKMAN (C. H.). *Arch. Biochem.*, 1945, **6**, 243.

[134] WOOD (H. G.), BROWN (R. W.), WERKMAN (C. H.) et STRUCKWISH (C. G.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 1812.

[135] WEINHOUSE (S.), MEDES (G.) et FLOYD (N. F.). *J. Biol. Chem.*, 1945, **158**, 411.

[136] COHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G. N.), NISMAN (B.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 1221.

[137] BARTLETT (G. R.) et BARRON (E. S. G.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 67.

[138] KALNITSKY (G.) et BARRON (E. S. G.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **170**, 83.

[139] SEEGAL (B. C.) et HOLDEN (M.). *Science*, 1945, **101**, 413.

[140] BARTH (H.), HOLDEN (M.) et SEEGAL (B. C.). *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 65.

[141] HOLDEN (M.), SEEGAL (B. C.) et BAER (H.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1947, **66**, 54.

[142] BAER (H.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **173**, 211.

[143] LIPMANN (F.). *Fed. Proc.*, 1945, vol. 4, n° 1.

[144] LIPMANN (F.) et KAPLAN (N. O.). *Fed. Proc.*, 1946, **5**, 145.

[145] KAPLAN (N. O.) et LIPMANN (F.). *Fed. Proc.*, 1947, **6**, 266.

[146] LIPMANN (F.), KAPLAN (N. O.), NOVELLI (G. D.), TUTTLE (L. C.) et GURARD (B. M.). *J. Biol. Chem.*, 1947, **167**, 869.

[147] LIPMANN (F.), KAPLAN (N. O.) et NOVELLI (G. D.). *Fed. Proc.*, 1947, **6**, 272.

[148] KAPLAN (N. O.) et LIPMANN (F.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **174**, 37.

[149] KOHN (H. L.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1943, **44**, 503.

[150] WOODS (D. D.). *Ann. Rev. Biochem.*, 1947, **16**, 605.

[151] PASTEUR (L.). *Bull. Soc. Chim.*, Paris, 9 mai 1862, 52.

[152] BEIJERINCK (M. V.). *Kon. Akad. van Wetensch. Amsterdam, Tweede Sectie*, 1893, Deel I, n° 10.

[153] SCHATTENFROH (A.) et GRASSBERGER (R.). *Arch. Hyg. Bakter.*, 1900, **37**, 54.

[154] BREDEMANN (G.). *Zentralbl. Bakter.*, 1909, II, **23**, 385.

[155] BOEKHOUT (F. W. J.) et VAN BEYNUM (J.). *Verslagen van landbouwkundige onderzoeken der Rijkslandbouwproefstations*, 1929, **34**, 25.

[156] VAN BEYNUM (J.) et PETTE (J. W.). *Zentralbl. Bakter.*, 1935, II, **93**, 198.

[157] VAN BEYNUM (J.) et PETTE (J. W.). *Zentralbl. Bakter.*, 1936, II, **94**, 413.

[158] BHAT (J. V.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 381.

[159] COHEN (G. N.) et COHEN-BAZIRE (G.). *Ces Annales*, 1949 (sous presse).

[160] SCHOEN (M.). *Le problème des fermentations*, Paris, 1926.

[161] DAVIES (R.). *Biochem. J.*, 1942, **36**, 582.

[162] SOODAK (M.) et LIPMANN (F.). *J. Biol. Chem.*, 1948, **175**, 999.

[163] BARKER (H. A.). *Antonie van Leeuwenhoek, J. Mikrobiol. Serol.*, 1939-1940, **6**, 201.

[164] BARKER (H. A.). *J. Biol. Chem.*, 1941, **137**, 153.

[165] BARKER (H. A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1937, **8**, 415.

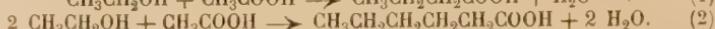
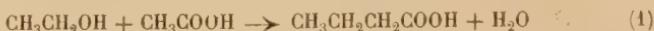
M. H. A. Barker : Le Dr Cohen vient de donner un excellent résumé des travaux qui ont été entrepris pour élucider la question des réactions chimiques impliquées dans la synthèse de l'acide butyrique. Je n'ai rien à ajouter à sa discussion de la littérature, mais je voudrais dire quelques mots des recherches récentes sur la synthèse des acides gras effectuées dans mon laboratoire par le Dr E. R. Stadtman. Ces recherches confirment en partie certaines des idées énoncées par d'autres auteurs, mais, d'autre part, elles montrent que certaines des théories admises sur le mécanisme de la formation de l'acide butyrique sont inexactes.

Ces recherches ont été faites avec un anaérobiose que nous avons appelé *Clostridium kluyveri* (1). Cette bactérie provoque un type inhabituel de fermentation de l'acide butyrique (2). La plupart des bactéries qui ferment de l'acide butyrique utilisent comme substrats des glucides ou des acides aminés. *C. kluyveri* ne peut attaquer de tels composés, mais forme les

(1) A. H. BARKER, *Anton. v. Leeuwenhoek*, 1947, **12**, 467.

(2) B. T. BORNSTEIN et H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 1948, **172**, 639.

acides butyrique et caproïque à partir de l'alcool éthylique et de l'acétate suivant les équations suivantes :



Les expériences avec l'acide acétique marqué par un carboxyle à C<sup>14</sup> ont montré que la formation de l'acide butyrique (équation 1) n'est pas le résultat d'une simple condensation de l'alcool éthylique et de l'acétate en acide butyrique, mais implique une oxydation de l'alcool éthylique en acide acétique ou ses dérivés. Ce processus est suivi par la condensation de deux molécules d'acide acétique ou de ses dérivés en un composé qui est réduit en acide butyrique (3). Ainsi les deux moitiés de l'acide butyrique dérivent de l'acide acétique.

Il y a deux ans environ, Stadtman entreprit d'obtenir des préparations d'enzymes exemptes de cellules qui pourraient être utilisées pour étudier de façon plus approfondie la réaction impliquée dans la synthèse de l'acide butyrique à partir de l'alcool éthylique et de l'acétate. En desséchant les bactéries, en les extrayant avec de l'eau exempte d'oxygène libre, il a réussi à obtenir une préparation enzymatique active et stable qui catalysait toutes les réactions cataboliques caractéristiques de la bactérie vivante.

Avec cette préparation, on a étudié l'oxydation de l'éthanol. On constata que l'oxygène peut être utilisé comme oxydant. Bien que l'emploi de l'oxygène ne corresponde pas aux conditions physiologiques nécessaires à la bactérie, puisque celle-ci est un anaérobiose strict et ne pousse pas en présence d'oxygène, il est très commode pour les expériences manométriques. Le degré auquel l'alcool éthylique est oxydé dépend de la quantité de phosphate inorganique présente dans le mélange entrant en réaction. En l'absence de phosphate inorganique, l'acétaldéhyde est presque le seul produit et a été obtenu avec un rendement de 85 p. 100 du rendement théorique. En présence d'un excès de phosphate inorganique, l'acétaldéhyde s'accumule peu ou pas du tout ; le principal produit de l'oxydation est alors le monoacétylphosphate. Ce composé est également formé par l'oxydation de l'acétaldéhyde en présence de phosphate inorganique (équation 3).



Cette réaction est tout à fait analogue à l'oxydation de la phosphoglycéraldéhyde et a pour résultat la formation d'un composé phosphorylé « riche en énergie ».

La transformation de l'acétylphosphate + acétate en butyrate a également été démontrée. Cette réaction exige un agent réducteur. L'agent réducteur normal utilisé par *C. kluyveri* est l'alcool éthylique, mais ce corps ne convient pas pour effectuer la transformation de l'acétylphosphate en butyrate, parce que de l'acétylphosphate se forme dans l'oxydation de l'alcool. Le meilleur agent réducteur pour ces expériences est l'hydrogène gazeux, qui peut être utilisé grâce à une hydrogénase présente dans la préparation enzymatique. Quand l'acétylphosphate et un excès d'acétate sont incubés avec la préparation enzymatique dans une atmosphère d'hydrogène, la réaction suivante se produit :



3) H. A. BARKER, M. D. KAMEN et B. T. BORNSTEIN, *Proceed. Nat. Acad. Sci. U. S.*, 1955, **31**, 373.

C'est une réaction complexe, se faisant certainement en plusieurs étapes. Comme le Dr Cohen l'a signalé, plusieurs chercheurs ont suggéré que l'acétoacétate est un produit intermédiaire dans la formation du butyrate. Nous avons donc étudié les réactions de l'acétoacétate dans la préparation enzymatique exempte de cellules effectuée à partir de *C. kluyveri*.

Plusieurs faits prouvent que l'acétoacétate ne peut pas être un intermédiaire de la synthèse du butyrate dans ce système, même s'il peut, comme il est certain, être converti en butyrate par les bactéries butyriques étudiées par Cohen. Je me bornerai ici à décrire un seul type d'expériences relatives à cette question.

Si l'acétoacétate est un précurseur de l'acide butyrique, on devrait s'attendre à ce que, comme l'acétylphosphate et l'acétate, il puisse être réduit en butyrate par l'hydrogène gazeux. Or, les expériences ont montré que l'acétoacétate n'est pas réduit, mais qu'il est converti en  $\beta$ -hydroxybutyrate à peu près molécule pour molécule. Ce dernier composé n'est pas formé en quantité décelable à partir de l'alcool éthylique et de l'acétate ou à partir de l'acétylphosphate et de l'acétate + hydrogène. Force est donc de conclure que l'acétoacétate n'entre pas normalement dans la synthèse de l'acide butyrique. Comme je l'ai déjà dit, d'autres expériences aboutissent également à la même conclusion.

Une discussion plus détaillée des réactions catalysées par les préparations enzymatiques de *C. kluyveri* exemptes de cellules sera publiée prochainement dans le *Journal of biological Chemistry*.

# BACTÉRIES ANAÉROBIES DES SÉDIMENTS MARINS

par JACQUES SENEZ

(Centre de Recherches Scientifiques Industrielles et Maritimes de Marseille et Laboratoire pour l'Etude de la Camargue et des Etangs Méditerranéens.)

Les premières études sur les bactéries des sédiments marins datent des travaux effectués par Certes (1884), au cours des expéditions du Travailleur et du Talisman. Les observations faites par cet auteur, ainsi que celles, un peu postérieures, de Russell (1892) dans le golfe de Naples et de Fischer (1894) dans les mers parcourues par l'expédition allemande du plancton, ont démontré la présence d'une flore microbienne abondante dans tous les échantillons examinés. Mais, faute de techniques appropriées, la flore étudiée par ces pionniers était exclusivement aérobie.

C'est à la suite de la découverte des bactéries sulfato-réductrices par Beijerinck en 1895 et de l'isolement par Van Delden (1904) de *Microspira aestuari* que l'attention a été attirée sur les anaérobies des sédiments marins. Vers la même époque, Benecke et Keutner (1903) signalaient la présence, au fond de la mer Baltique, de bactéries anaérobies fixatrices de l'azote atmosphérique. Ces deux découvertes presque simultanées ont eu un retentissement considérable du fait de leur intérêt général et ont contribué à jeter une lumière nouvelle sur le problème de la fertilité des océans.

Par la suite, le nombre des processus biochimiques naturels dans lesquels interviennent les bactéries anaérobies des dépôts pélagiques s'est accru, notamment par la mise en évidence d'organismes cellulolytiques et d'organismes lipolytiques.

Dans ces dernières années, les notions récentes sur le rôle des bactéries dans la formation des pétroles ont ouvert à la bactériologie des sédiments marins une nouvelle voie appelée à un grand développement et susceptible de conduire à d'importantes conséquences pratiques. En même temps que se précisent les mécanismes des diverses fermentations anaérobies, on voit s'approfondir nos connaissances sur la composition chimique des sédiments et sur les conditions physico-chimiques qui caractérisent ce milieu naturel.

COMPOSITION CHIMIQUE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES  
DES SÉDIMENTS MARINS.

Les sédiments marins constituent un milieu biologique très particulier et dont les caractéristiques régissent étroitement la nature et le nombre des micro-organismes qui y vivent. Au contraire de l'eau de mer libre, ils sont remarquablement riches en matières organiques, dont l'ensemble constitue ce que Waksman (1933) a proposé de désigner, par analogie avec l'humus terrestre, sous le nom d' « *humus marin* ». Leur teneur en matières organiques se détermine aisément en dosant le carbone organique total, ou l'azote organique total, et en multipliant les valeurs trouvées par des coefficients appropriés (Waksman, 1933; Trask, 1939; Boysen-Jensen, 1914). Les divers auteurs qui ont effectué ces déterminations ont noté la forte prédominance du carbone sur l'azote, et ont également signalé que le taux du carbone et celui de l'azote sont dans un rapport à peu près constant, dont la valeur moyenne se situe aux environs de  $C/N = 11$ , malgré de fortes variations des termes de ce rapport en valeur absolue. Ainsi que le fait remarquer Waksman (1933), la fixité du rapport  $C/N$  permet de penser que l'humus marin a une composition chimique relativement uniforme et indépendante des facteurs qui régissent son abondance.

La teneur totale en matières organiques varie en fonction de la configuration du fond, des courants, et surtout en fonction du type sédimentaire et de la distance par rapport à la terre ferme. Elle est d'autant plus élevée que le sédiment est constitué de particules plus fines ; relativement faible dans les fonds de sable, elle atteint ses valeurs maxima dans les fonds de vase. Les sédiments prélevés en eaux profondes et en haute mer contiennent en général moins de 1 p. 100 de matières organiques, alors que, près du rivage, la teneur moyenne est de l'ordre de 2,5 p. 100 et peut atteindre la valeur considérable de 10 p. 100 dans les fonds d'eaux stagnantes, riches en hydrogène sulfuré, comme celles de la mer Noire et de certains fjords norvégiens.

La masse de matière organique produite par les organismes végétaux et animaux des couches superficielles de la mer est elle-même très variable. D'après Trask (1939), elle serait en moyenne de 1.000 g. environ par an et par mètre carré et la proportion qui finit par atteindre le fond et s'y sédimerter serait de 0,2 à 2 p. 100. L'enfouissement de ces substances organiques ne se produit qu'avec une extrême lenteur. Se fondant sur une stratification saisonnière relevée dans la vase de la Mer Noire, Schokalsky (1928) estime à cinquante années le temps nécessaire pour que se dépose une couche de vase de 1 cm. d'épaisseur. En haute mer, à l'abri de tout apport terrigène, le phénomène paraît être

considérablement plus lent, de l'ordre de 1 cm. par mille ans (Rittenberg, 1940).

La teneur organique d'un sédiment donné varie avec sa profondeur, c'est-à-dire avec son âge. A mesure qu'on s'enfonce plus profondément, elle décroît de façon lente et progressive, et on observe simultanément une augmentation du rapport C/N. Ce dernier fait est attribué par Waksman à ce que, dans les conditions anaérobies des couches profondes, les composés azotés seraient décomposés plus aisément et plus vite que les composés carbonés ternaires.

On ne possède encore que peu de données sur la nature chimique de l'humus marin. Les rares investigations effectuées dans ce sens, en particulier celles de Waksman (1933) et de Trask (1939), ont cependant fourni des résultats d'un grand intérêt bactériologique en montrant que les sédiments marins contiennent une grande variété de composés organiques, pour la plupart de poids moléculaire élevé et de structure complexe. Par extraction alcaline, suivie de précipitations fractionnées au moyen de l'acide chlorhydrique, de la soude et de l'alcool, Waksman a pu séparer une fraction «  $\alpha$  », ligno-protéique, une fraction «  $\gamma$  », gluco-protéique, et un résidu, surtout formé de chitine et autres carbohydrates complexes. La fraction ligno-protéique, qui représente environ 35 p. 100 de l'humus total, contient plus de 85 p. 100 de lignine. Elle est très semblable à la fraction correspondante obtenue à partir du terreau de jardin, mais s'en distingue par une teneur azotée plus forte, ce qui paraît être lié à la part plus grande des résidus d'origine animale dans la formation des dépôts marins. Quant à la fraction  $\gamma$ , elle contient une très forte proportion d'acides uroniques. A côté de ces constituants principaux, Waksman a signalé la présence de faibles quantités de lipides et de cires.

Cette étude analytique a été reprise et complétée par Trask (1939), dont l'importante publication contient de nombreuses données numériques sur la composition chimique de l'humus marin, et notamment sur sa teneur en lipides.

Parmi les constituants organiques des sédiments, une mention particulière doit être faite des hydrocarbures. Alors que Trask (1939) n'avait pas réussi à déceler leur présence dans les échantillons étudiés par lui, Haas (1943) en a extrait des quantités allant de 10 à 20 mg. par 100 g. de vase récente. L'insuccès des premières recherches était dû à la faible concentration de ces composés et à leur rapide destruction par la flore aérobie lorsqu'il s'écoule un certain délai entre le prélèvement et l'analyse de l'échantillon. Le fait d'avoir constaté la formation naturelle d'hydrocarbures dans les dépôts océaniques récents est un important argument à l'appui des théories qui attribuent la formation du

pétrole à l'activité de la flore bactérienne anaérobie des sédiments marins.

Des divers travaux qui viennent d'être brièvement analysés, on peut conclure que, malgré son abondance relative, l'humus marin est surtout constitué par des composés complexes et dont on peut attendre qu'ils soient hautement résistants à l'attaque microbienne. Quelques expériences pratiquées par Waksman (1933) ont montré que l'humus marin desséché, remis en suspension et ensemencé avec des bactéries aérobies de l'eau de mer, se décompose activement *in vitro*, et que sa décomposition est même plus rapide que celle de l'humus terrestre placé dans des conditions expérimentales similaires. Il importe toutefois de souligner que ces observations ont été faites en aérobiose. Comme le fait remarquer ZoBell (1939), il est vraisemblable que dans les conditions naturelles, c'est-à-dire en anaérobiose, les substances humiques sont résistantes, ou ne se décomposent qu'avec une extrême lenteur. A l'appui de cette thèse, Trask fait valoir, dans des remarques introductives à la publication de ZoBell et Anderson (1936), le fait que la teneur organique moyenne des roches sédimentaires d'âges géologiques différents est encore assez élevée et peu inférieure à celle des sédiments marins récents.

Du point de vue de leurs caractéristiques physico-chimiques, les sédiments marins constituent de façon générale un milieu fortement réducteur. Les mesures de potentiel d'oxydo-réduction faites par ZoBell (1936, 1937 et 1939) et par ZoBell et Anderson (1936), à l'aide des méthodes colorimétriques et potentiométriques, indiquent une très rapide décroissance du Eh en fonction de la profondeur. Alors que l'eau, avec laquelle la surface du fond est en contact, est constamment à un Eh positif, le Eh s'abaisse à — 0,12 volt dès les trois premiers centimètres de vase et continue à décroître plus ou moins progressivement avec la profondeur. Vers 60 cm., on trouve habituellement des valeurs de l'ordre de — 0,37 v. et on a même noté la valeur extrême de — 0,58 v. Les mesures de pH pratiquées sur les mêmes échantillons ont montré une réaction nettement alcaline (pH 7,8 à 8,2) qui est comparable à celle de l'eau de mer libre et ne paraît pas varier avec la profondeur.

Le potentiel d'oxydo-réduction des sédiments marins varie dans d'assez larges limites, suivant la nature des dépôts. Si les conditions réductrices prévalent de façon très générale et tendent à créer un milieu strictement anaérobie, cette règle comporte cependant quelques exceptions importantes, comme celle des sédiments bruns des mers arctiques. Dans ce type sédimentaire, qui est caractérisé par une teneur exceptionnellement élevée en hydrate ferrique et en oxydes de manganèse, Brujevicz (1938) a relevé une valeur moyenne du Eh atteignant + 0,105 v., dans la

mer de Barentz et + 0,270 v. dans la mer de Kara, c'est-à-dire des conditions nettement oxydantes.

L'estimation des propriétés réductrices d'un sédiment peut s'exprimer, en dehors du potentiel d'oxydo-réduction, par la « capacité de réduction » ou « pouvoir réducteur », c'est-à-dire par la quantité d'oxygène que peut absorber l'échantillon. Cette quantité dépend de trois facteurs principaux (ZoBell, 1939), qui sont l'absorption chimique par les corps métalliques auto-oxydables, la respiration des bactéries anaérobies et la consommation de l'oxygène par les enzymes libres concentrés au fond de la mer où ils activeraient diverses réactions chimiques en dehors des micro-organismes originels (Kreps, 1934). Cette capacité de réduction décroît habituellement avec la profondeur.

Ainsi les données actuelles sur les sédiments marins permettent de les considérer, du point de vue bactériologique, comme un milieu organique anaérobie dont les constituants sont relativement stables et résistants à la dégradation microbienne.

#### TECHNIQUES EMPLOYÉES POUR LE PRÉLÈVEMENT ET LA NUMÉRATION DES BACTÉRIES ANAÉROBIES DANS LES SÉDIMENTS MARINS.

Le prélèvement d'échantillons sédimentaires en vue de leur étude bactériologique s'effectue habituellement au moyen de tubes-carolliers, dont un excellent type est celui d'Emery et Dietz (1941). On trouvera dans le travail de ces auteurs ainsi que dans l'ouvrage de ZoBell (1946) une description détaillée de ces dispositifs, qui peuvent permettre d'obtenir des échantillons atteignant plusieurs mètres de long. La carotte la plus longue qui ait été examinée bactériologiquement a été obtenue par ZoBell sur un fond de vase de la côte californienne ; elle mesurait 5,1 m., ce qui correspond, en tenant compte du tassement, à une pénétration d'environ 7,5 mètres. Au cours de l'expédition suédoise en mers profondes, Pettersson (1947-1948) a utilisé un appareil construit par Kullenberg, avec lequel il a réussi à prélever dans l'Atlantique et la Méditerranée des carottes mesurant jusqu'à 10 et 15 m. de long. Malheureusement, aucune étude bactériologique n'a été faite sur ce matériel.

Pour estimer l'abondance des bactéries anaérobies dans les sédiments, on doit évidemment renoncer aux méthodes de numération microscopique directe et recourir à des numéralions indirectes par culture. Le choix du milieu nutritif et la réalisation d'une anaérobiose convenable présentent de grandes difficultés qui expliquent sans doute en partie le petit nombre de recherches effectuées dans cette voie.

Dans leurs études sur les rapports numériques entre les populations aérobies et anaérobies, ZoBell et Anderson (1936) et Ritten-

berg (1940) ont utilisé un milieu de base unique dont la composition est la suivante :

Bacto-peptone . . . . .	0,3 g
Protéose-peptone . . . . .	0,2
Beef extract . . . . .	0,2
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,03
Agar . . . . .	4,5
Eau de mer . . . . .	100

Le perchlorure de fer a pour rôle de produire un précipité qui entraîne diverses impuretés nuisibles et qu'on élimine par filtration avant de stériliser le milieu. Les résultats obtenus seraient de six à quatre-vingts fois supérieurs à ceux qu'on obtient avec les milieux au poisson et au nutrose utilisés par Benecke pour ses numérations des aérobies.

Dans son récent ouvrage, ZoBell (1946) a proposé un autre milieu paraissant mieux adapté au développement des anaérobies :

Bacto-peptone . . . . .	5 g.
Phosphate ferrique . . . . .	0,1
Glucose . . . . .	10
Thioglycollate de sodium . . . . .	1
Bleu de méthylène . . . . .	0,002
Eau de mer conservée . . . . .	1.000

Le milieu peut être solidifié par adjonction d'agar (1,5 p. 100). Le bleu de méthylène contribue à abaisser le Eh et sert d'indicateur d'anaérobiose. Le milieu de ZoBell, s'il est protégé contre l'oxygène atmosphérique après stérilisation, a un Eh généralement inférieur à — 0,1 v.

Le milieu de base, coulé en boîtes de Petri, est ensemencé avec une dilution appropriée du matériel à examiner, puis placé dans un récipient hermétiquement clos contenant du pyrogallol ou un mélange de sulfate chromeux et d'acide sulfurique.

Lorsqu'on désire pratiquer les ensemencements sur le terrain, on peut assurer une anaérobiose suffisante en faisant reposer sur la surface de la gélose un disque de verre stérile. Le fait que le bleu de méthylène incorporé au milieu ne se recolore pas et demeure à l'état de leuco-dérivé, sauf à la périphérie des disques, permet de contrôler l'anaérobiose effective qui est ainsi maintenue assez longtemps pour permettre la numération des colonies dans des conditions adéquates. Il est indiqué, pour ce procédé, de réduire à 0,1 p. 100 la concentration du glucose, de façon à éviter une production abondante de gaz et la fragmentation du milieu.

Rittenberg, Anderson et ZoBell (1936) ont mis au point une technique de numération en gélose profonde. Les tubes spécialement construits dans ce but ont une section ovale, qui facilite beaucoup le dénombrement des colonies, et mesurent 380 mm.

le long, les diamètres transversaux étant de 6 et 14 mm. Le milieu de base gélosé est stérilisé dans des tubes à essai ordinaires et régénéré par séjour prolongé à 100°, immédiatement avant l'emploi, de façon à éliminer l'oxygène. Après refroidissement à 42°, le milieu estensemencé avec 1 cm<sup>3</sup> d'une dilution appropriée du matériel à examiner, puis transféré aseptiquement dans un tube ovale, stérilisé à part. Sitôt la solidification achevée, on recouvre le milieu avec une couche épaisse de gélose au bleu de méthylène réduit. Cette couche, qui doit avoir environ 40 mm., empêche la pénétration de l'oxygène et indique le degré d'anaérobiose. Les tubes ensemencés sont incubés à la température désirée et les colonies sont comptées en lumière réfléchie, devant un fond noir. Les numérations effectuées par cette méthode donnent des chiffres plus élevés et des résultats plus reproductibles que ceux des techniques sur gélose en plaque. L'écart-étalon calculé sur différentes séries de 50 déterminations est de 7 p. 100, valeur comparable à celle que donne la numération classique des aérobies en boîtes de Petri, tandis que les numérations anaérobies en jarre de Novy donnent des écarts-étalon deux ou trois fois plus élevés.

Les procédés de numération par dilutions successives et ensemencement en milieu liquide présentent certains avantages dans le cas particulier des anaérobies, bien que, par ailleurs, on considère généralement leurs résultats comme étant moins reproductibles que ceux des numérations sur milieu solide. En milieu liquide, il est en effet plus facile d'obtenir l'anaérobiose, soit en disposant les tubes dans une jarre de Novy ou de Mason (ZoBell, 1946), dont l'oxygène a été éliminé chimiquement, soit qu'on préfère sceller chaque tube après y avoir fait le vide.

Une fois ensemencés, les milieux de numération sont incubés à une température de 21-23°. En général, les bactéries anaérobies des sédiments se développent plus lentement que les aérobies, et il faut souvent poursuivre l'incubation jusqu'à quinze jours pour voir se stabiliser le nombre des colonies (ZoBell et Anderson, 1936).

Tous les auteurs qui ont effectué des numérations bactériologiques à partir de l'eau de mer ou des sédiments marins insistent sur la nécessité de procéder aux ensemencements aussitôt que possible après le prélèvement des échantillons. Au cours de la conservation, il se produit en effet en quelques heures une très rapide et très importante augmentation du nombre total des germes, en même temps qu'on observe une simplification de la flore par diminution de la variété des espèces représentées. Ce phénomène, qui a été noté pour la première fois par Whipple (1901), a fait, par la suite, l'objet de nombreuses interprétations et paraît relever de causes multiples. Dans le cas particulier des sédiments, il est vraisemblable que l'accroissement de la

population bactérienne durant la conservation est surtout le fait des organismes aérobies qui sont à l'état quiescent dans le milieu naturel privé d'oxygène et se développent activement sitôt que l'échantillon est exposé à l'air.

#### DISTRIBUTION DES BACTÉRIES ANAÉROBIES DANS LES SÉDIMENTS MARINS.

Si la littérature est relativement riche en données concernant la distribution des bactéries aérobies dans les sédiments, il n'en est pas de même pour la flore anaérobie, dont l'estimation numérique d'ensemble a fait l'objet d'un très petit nombre seulement de publications, parmi lesquelles il convient de citer celles de ZoBell et Anderson (1936), de ZoBell (1938-1939) et de Rittenberg (1940). Avant d'analyser les résultats obtenus par ces auteurs, on doit souligner le fait que les chiffres dont il va être fait mention ont tous été tirés de numérations indirectes par culture et sont donc très inférieurs à ceux des populations réelles. Comparant entre elles les diverses méthodes de numération, Butkevitch (1932) et Waksman et al. (1933) ont constaté que les procédés microscopiques directs donnent constamment des chiffres près de mille fois supérieurs à ceux des cultures aérobies sur milieu solide. Dans le cas des anaérobies, on doit s'attendre au même décalage entre les populations réelles et leur estimation indirecte. Ces différences sont dues non seulement au fait que l'examen microscopique ne permet pas de distinguer les bactéries vivantes de celles qui sont mortes, mais encore et surtout au fait que les milieux nutritifs employés dans les méthodes de numération par culture ne peuvent convenir indistinctement à toutes les espèces bactériennes présentes.

Une autre remarque préliminaire concerne le critère servant à distinguer les organismes aérobies et anaérobies. Dans le groupe des anaérobies sont classées toutes les bactéries qui se développent en l'absence d'oxygène atmosphérique, c'est-à-dire à la fois les anaérobies stricts et les anaérobies facultatifs. ZoBell et Anderson (1936) et Rittenberg et al. (1936) se contentent d'indiquer qu'une proportion importante des anaérobies ainsi définis se révèlent, après isolement et repiquage, être des anaérobies stricts, mais leur abondance relative n'est pas précisée davantage.

La répartition des bactéries anaérobies dans les sédiments marins dépend étroitement de la profondeur. D'une façon générale, les anaérobies sont moins nombreux que les aérobies et le demeurent quelle que soit la profondeur des carottes examinées, même lorsque celles-ci atteignent plusieurs mètres. Par contre, leur nombre décroît plus lentement en fonction de la profondeur, de telle sorte que vers 60 cm. le rapport anaérobies/aérobies finit

par être de l'ordre de 1/2. Les chiffres suivants, empruntés à ZoBell et Anderson (1936), sont un exemple typique des populations dénombrées dans les fonds de vase (tableau I) :

TABLEAU I. — Répartition des bactéries dans un échantillon de sédiment marin.

(D'après ZoBell et Anderson, 1936.)

PROFONDEUR du sédiment en centimètres	ANAÉROBIES par gramme	AÉROBIES par gramme	RAPPORT anaérobies aérobies	OXYGÈNE absorbé par milligramme	Eh en volts
0-3 . . . . .	1.160.000	74.000.000	1/64	2,8	- 0,12
4-6 . . . . .	14.000	314.000	1/21	1,3	- 0,29
14-16 . . . . .	8.900	56.000	1/6	0,6	- 0,37
24-26 . . . . .	3.100	10.400	1/3	0,7	- 0,32
44-46 . . . . .	5.700	28.100	1/5	0,3	- 0,37
66-68 . . . . .	2.300	4.200	1/2	0,4	- 0,34

La diminution de la flore bactérienne totale en fonction de l'épaisseur du sédiment et l'augmentation corrélative de la proportion des anaérobies peuvent être considérées comme une règle générale. Il s'en faut cependant que la répartition des germes soit toujours régulière et homogène. Assez fréquemment, on a constaté des variations brusques des populations entre deux points très proches d'une même carotte, ou entre deux échantillons prélevés à faible distance l'une de l'autre. Les courbes de distribution moyenne n'ont été établies qu'à partir d'un nombre assez restreint de déterminations et on ne saurait les généraliser sans faire quelques réserves. Elles n'ont de valeur certaine que lorsqu'elles s'appliquent à un sédiment bien défini et homogène (Rittenberg, 1940).

Au-dessous de 60 cm. la densité des anaérobies, comme celle des aérobies, devient très faible. Mais la limite inférieure de la biosphère n'a jamais été atteinte. Les rares numérations effectuées sur des prélèvements atteignant ou dépassant 3 m. de profondeur ont toutes montré la présence d'aérobies et d'anaérobies. L'étude bactériologique des populations vivant dans les couches sédimentaires très profondes présente un intérêt évident en ce qui concerne les controverses sur le rôle des micro-organismes dans la formation du pétrole, mais les données acquises dans ce domaine sont encore très peu nombreuses et il serait nécessaire de les multiplier avant de pouvoir en tirer des conclusions précises. Il faut d'ailleurs considérer que l'épaisseur de la couche sédimentaire accessible aux investigations bactériologiques est relativement très faible par rapport à l'épaisseur totale des dépôts

océaniques. C'est ainsi que, d'après les échogrammes de Pettersson (1947), la couche de sédiments meubles atteindrait, en certains points de l'océan Atlantique, 2.500 m. d'épaisseur. L'âge de ces sédiments serait considérable, si on admet que, suivant le même auteur, leur accroissement se ferait, dans les conditions actuelles, à raison de 80 mm. par mille années. Ces sédiments profonds sont hors d'atteinte des moyens de prélèvement actuels, et, pour avoir quelque lumière sur les limites inférieures de la biosphère, on doit se rapporter aux investigations de Bastin (1926), de Gahl et Anderson (1928) et d'Issatchenko (1946) sur la flore bactérienne des puits pétrolifères.

La présence de nombreuses bactéries aérobies viables dans les sédiments profonds, où l'oxygène fait totalement défaut, est un fait assez surprenant. Selon ZoBell et Anderson (1936), il faudrait supposer que ces organismes sont soit des anaérobies facultatifs, soit des cellules en état de vie latente (« resting bacteria »). En faveur de cette dernière interprétation, on peut citer les observations de Butkevitch (1938), qui a effectué des numérations microscopiques directes sur la vase de la mer Caspienne et a noté, au-dessous de 20 cm., la disparition des formes végétatives et la présence presque exclusive de spores.

Une autre constatation d'apparence paradoxale est le nombre peu élevé des anaérobies dans un milieu où les conditions physico-chimiques et la concentration en matières organiques paraissent extrêmement favorables au développement de ce groupe de micro-organismes. La raison de cette pauvreté relative réside en partie dans l'imperfection des techniques de numération indirecte et notamment dans la défectuosité du milieu nutritif de base. Mais les conditions du milieu naturel doivent également intervenir pour limiter la multiplication bactérienne. Rittenberg (1940) souligne en particulier l'influence possible des basses températures existant au fond de la mer (température toujours inférieure à + 5°) et de la faible teneur en eau libre dans les couches sédimentaires profondes. Ayant procédé à une analyse statistique des données sur la distribution verticale des bactéries, ZoBell (1939) a constaté que la courbe représentative des populations revêt, dans le cas des aérobies, une forme logarithmique, ce qui paraît indiquer la mort progressive de ce groupe au-dessous d'une profondeur de 5 à 10 cm. Dans le cas des anaérobies, par contre, l'interprétation statistique semble indiquer que les organismes demeurent actifs jusque vers 40 à 60 cm., niveau où apparaît la courbe logarithmique de léthalité.

Il ne semble pas qu'on ait procédé à des tentatives pour isoler systématiquement les bactéries anaérobies des sédiments et pour étudier leur faunistique dans son ensemble. Parmi les 60 espèces nouvelles de bactéries marines qu'ont décrites ZoBell et Upham

(1944), on ne relève pas une seule espèce anaérobie stricte. Comme on le verra, les rares espèces anaérobies isolées et identifiées à partir des sédiments marins sont des espèces découvertes et étudiées à cause de leur participation à tel ou tel cycle métabolique particulier.

#### BACTÉRIES ANAÉROBIES FIXATRICES DE L'AZOTE.

Benecke et Keutner (1903) sont les premiers à avoir signalé la présence dans la mer de bactéries fixatrices de l'azote. Au cours de recherches pratiquées dans la baie de Kiel, ces auteurs ont isolé, à partir de l'eau et de la vase du fond, l'organisme anaérobie *Clostridium pastorianum* qui venait d'être découvert dans le sol peu auparavant par Winogradsky. Dans le plancton de la surface, Benecke et Keutner constataient par ailleurs la présence de l'organisme aérobie *Azotobacter chroococcum*.

Ces bactéries fixatrices de l'azote ont été retrouvées par Keutner (1905) dans la mer du Nord, l'océan Indien, l'archipel malais et sur la côte d'Afrique : par Bavendamm (1932) dans la vase calcaire des Bahamas, et par Waksman, Hotchkiss et Carey (1933) dans le golfe du Maine et le George's Bank. Ces observations paraissent démontrer que les bactéries fixatrices de l'azote sont des hôtes normaux de la mer et ont une répartition universelle.

Comme milieu d'enrichissement, Benecke et Keutner ont employé un milieu de Winogradsky préparé avec de l'eau de mer, à laquelle étaient ajoutés 0,04 à 0,10 p. 100 de phosphate diphosphatique et 0,02 à 0,05 p. 100 de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . La source carbonée énergétique était assurée par 4 p. 100 de glucose ou de mannitol. En outre, l'adjonction de 0,25 p. 100 de carbonate de calcium s'est révélée nécessaire pour neutraliser les acides formés au cours de la fermentation anaérobie des carbohydrates. Avec ce milieu, la fixation d'azote par 100 cm<sup>3</sup> a varié entre 5,7 et 15 mg. en présence de carbonate, et entre 0,9 et 9,0 mg. en l'absence de carbonate.

Les recherches de Bavendamm ont été effectuées avec un milieu similaire, mais ne contenant pas de sulfate de magnésium. Waksman, Hotchkiss et Carey (1933) se sont arrêtés à un milieu de base unique destiné à la fois à la culture de l'anaérobie *Clostridium pastorianum* et de l'aérobie *Azotobacter chroococcum* :

Eau de mer . . . . .	4.000
$K_2HPO_4$ . . . . .	0,5
" Ferro-ligno-protéinate " . . . . .	0,5
Source carbonnée (glucose, mannitol ou acétate de calcium) . . . . .	20

Le complexe ferro-ligno-protéique entrant dans la composition

de ce milieu est destiné à assurer les besoins en fer des *Azobacter* et ne paraît pas jouer de rôle important en ce qui concerne le développement des clostridies. Par contre, pour les cultures anaérobies, il est indispensable d'ajouter 2 à 3 g. de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  par 100 cm<sup>3</sup> de milieu. La source énergétique convenant le mieux au développement de la clostridie s'est révélée être le glucose.

Etant donné la tolérance assez grande de *Clostridium pastorianum* à l'égard de l'oxygène, les cultures peuvent être faites à l'air libre, comme l'ont montré Waksman et ses collaborateurs, à la seule condition que la masse du milieu liquide soit suffisamment profonde.

Au bout de quatre à dix jours d'incubation, les cultures de Waksman, Hotchkiss et Carey ont présenté un développement bactérien abondant avec production de gaz et d'acide butyrique. L'examen microscopique des cultures montre la présence de bactéries sporulées granuleuses caractéristiques, et le dosage de l'azote organique total établit la preuve de leur activité nitro-fixatrice.

Waksman et ses collaborateurs ont procédé à quelques expériences dans le but de déterminer l'abondance numérique de *Clostridium pastorianum* dans les sédiments et dans l'eau libre. Les résultats, obtenus au moyen de la méthode des dilutions successives, indiquent que *Clostridium pastorianum* est très largement représenté dans tous les échantillons de vase examinés et se trouve également dans l'eau libre, mais que, dans ce dernier habitat, sa présence est inconstante et toujours peu nombreuse.

Benecke et Keutner (1903) n'ont pas réussi à obtenir *Clostridium pastorianum* en culture pure et ont constaté que cet organisme est constamment associé à d'autres bactéries dont l'activité nitro-fixatrice n'a pu être déterminée avec certitude. Parmi les germes associés, ces auteurs ont décrit, sous le nom de *Clostridium giganteum*, une clostridie anaérobie de grande taille, à extrémités effilées, et dont les sporanges contiennent fréquemment plusieurs spores volumineuses (2,5 à 1,5  $\mu$ ). Dans les cultures d'enrichissement impures, il a également été noté la présence très fréquente d'un bacille\* fin, légèrement incurvé, à spore terminale, qui n'a pu être cultivé sur gélose inclinée et que Benecke et Keutner rattachent au genre *Paraplectrum* (Fischer).

Les clostridies nitro-fixatrices des sédiments marins ont été identifiées avec l'espèce *Clostridium pastorianum* par suite de leur caractère de ferment butyrique et de leur ressemblance morphologique avec la bactérie de Winogradsky. Il est toutefois à noter que, dans le cas des sédiments marins, on a obtenu des cultures positives avec des milieux d'enrichissement où la seule

sourcee de carbone était le mannitol, c'est-à-dire un carbohydrate qui n'est normalement pas fermenté par *Clostridium pastorianum*. Cette anomalie peut s'expliquer par le fait qu'il s'agissait de cultures impures, mais il conviendrait d'établir une comparaison plus approfondie entre les souches marines et les souches terrestres de clostridies azo-fixatrices, avant de conclure à leur identité.

L'importance réelle qu'on doit accorder à la fixation bactérienne de l'azote dans la mer reste encore à déterminer. Ainsi que le font remarquer Waksman, Hotchkiss et Carey, la présence d'organismes qui assimilent l'azote moléculaire dans les conditions artificielles du laboratoire ne démontre pas que le même phénomène se produise dans les conditions naturelles ni surtout qu'il y atteigne une échelle suffisante pour accroître de façon sensible les ressources du milieu marin en azote combiné. Si le rôle des bactéries symbiotes des légumineuses est aujourd'hui bien établi, il n'en est pas de même en ce qui concerne le groupe des bactéries non-symbiotes, seul représenté dans la mer. La fixation de l'azote est une réaction endothermique, qui nécessite un apport d'énergie considérable, et ne paraît pas compatible avec les conditions naturelles de l'eau ou des sédiments (von Brand, Rakestraw et Zabor, 1942).

#### BACTÉRIES ANAÉROBIES SULFATO-RÉDUCTRICES.

La réduction naturelle des sulfates dans les sédiments marins est un phénomène extrêmement répandu et dont la grande importance biologique a depuis longtemps été reconnue par les océanographes. Les vases noires ou bleues, colorées par le sulfure de fer, se rencontrent fréquemment dans l'océan jusqu'à une profondeur d'une trentaine de mètres, et sont la règle dans la Mer Noire, où on les observe à toutes profondeurs. Dans la Mer Noire, l'hydrogène sulfuré, qui se forme au niveau du fond, diffuse dans l'eau surnageante et y atteint des concentrations très élevées. Au voisinage des grands fonds, l'eau de la Mer Noire peut en contenir jusqu'à  $655 \text{ cm}^3$  par litre. À mesure qu'on s'éloigne du fond, la concentration décroît progressivement, mais à 200 m. au-dessous de la surface la présence d' $\text{H}_2\text{S}$  est encore appréciable, sa teneur moyenne étant à ce niveau d'environ  $30 \text{ cm}^3$  par litre.

Dès 1893, sir John Murray et Irvine avaient analysé l'eau d'imbibition provenant de divers échantillons de vases bleues prélevées au cours de l'expédition du *Challenger*, et avaient constaté que leur pauvreté en ions sulfate s'accompagne d'un enrichissement proportionnel en ions carbonate. De leurs obser-

vations, ces auteurs concluaient que la réduction des sulfates est un processus biologique lié à la décomposition bactérienne des résidus organiques.

En 1893 également, Zelinsky et Broussilovsky avaient isolé a partir du fond de la Mer Noire une bactérie qu'ils ont dénommée *Bacterium hydrosulfuricans ponticus* et dans laquelle ils voyaient l'agent spécifique de la réduction des sulfates. Mais les cultures réalisées par ces auteurs étaient impures et le germe décrit fut par la suite identifié par Nadson avec *Proteus vulgaris*, germe banal de la putréfaction.

La découverte des bactéries sulfato-réductrices véritables est due, on le sait, à Beijerinck (1895). L'organisme anaérobie, isolé par ce bactériologiste hollandais à partir de la vase d'un canal d'eau douce, a d'abord été décrit sous le nom de *Spirillum desulfuricans*, dénomination qui, par la suite, s'est révélée impropre. Beijerinck a souligné l'importance considérable de la réduction anaérobie des sulfates dans la nature et a émis l'hypothèse que des organismes analogues à celui qu'il avait étudié devaient être la cause de la forte teneur de la Mer Noire en hydrogène sulfuré.

En 1904, Van Delden, reprenant les travaux de Beijerinck, et procédant à l'ensemencement de sédiments marins prélevés sur les côtes de Hollande, a isolé et obtenu en cultures pures un germe qui ne se distingue de celui de Beijerinck que par sa tolérance à l'égard du chlorure de sodium. Les deux organismes se développent dans les eaux saumâtres, de faible salinité, mais alors que la bactérie de Beijerinck peut être cultivée en l'absence de sel, celle de Van Delden exige la présence de chlorure de sodium et tolère des concentrations salines beaucoup plus élevées, dépassant 30 g. par litre. Du fait de cette halophilie obligatoire, le germe de provenance marine a été considéré par Van Delden comme une espèce distincte, *Microspira aestuari*, le nom générique de *Microspira* ayant par ailleurs été attribué par Migula en 1900 à l'organisme de Beijerinck.

Grâce à l'obtention de cultures pures, Van Delden a pu préciser le comportement biochimique de ces organismes et établir que *Microspira aestuari* est capable de réduire non seulement les sulfates, mais encore les sulfites, les thiosulfates et, d'une manière limitée, les nitrates.

L'hypothèse de Beijerinck sur la présence d'anaérobies sulfuro-reducteurs dans la Mer Noire s'est trouvée pleinement vérifiée lorsqu'en 1924, Issatchenko eut mis en évidence, à partir d'échantillons de vase noire prélevée dans cette mer, des micro-organismes en tous points similaires au *Microspira aestuari* de Van Delden. Par la suite les bactéries sulfato-réductrices marines ont été retrouvées par divers auteurs, notamment par Baven-damm (1932) dans l'archipel des Bahamas, par Miss Judd (1934)

sur la côte d'Afrique du Sud, par Butkewitch (1938) dans la Caspienne et la mer d'Azov. Elles ont, d'autre part, été cultivées par Bastin (1926), par Gahl et Anderson (1928), et par Ginsburg-Karagitscheva (1933) à partir de l'eau des puits de pétrole et cette constatation, qui confirme l'universalité de leur répartition, indique également l'importance de leur activité géochimique.

Etudiant l'halophilie de leurs souches, Gahl et Anderson (1928) ont constaté toute une série d'intermédiaires entre les types de Beijerinck et de Van Delden et ont émis l'hypothèse qu'il s'agit en fait d'un même organisme adapté à des conditions naturelles différentes. Cette conception a été reprise par Baars (1931) qui en a fait la démonstration expérimentale en parvenant à adapter *Microspira desulfuricans* à des salinités de plus en plus élevées. De même, le *Microspira thermodesulfuricans* d'Elion s'est révélé n'être, comme *M. aestuari*, qu'une variété adaptative de *M. desulfuricans*. Par contre, Baars a montré qu'il est nécessaire de distinguer *M. desulfuricans*, et ses variétés halophile et thermophile, d'une autre bactérie sulfato-réductrice douée d'un comportement biochimique différent. Cet organisme, contrairement à celui de Beijerinck, est polyphage et utilise, comme source d'hydrogène, les acides gras inférieurs, les alcools secondaires et tertiaires, et de nombreux glucides. L'espèce ainsi individualisée par Baars a reçu le nom de *Vibrio rubentschicki*. Elle a été primivement isolée à partir de l'eau douce, mais il est vraisemblable qu'elle est également représentée dans les sédiments marins, comme semble l'indiquer le résultat de recherches récentes sur la dégradation anaérobie des acides gras par la flore microbienne de la vase marine (Rosenfeld, 1948).

Tout récemment, Prévot (1948) a montré que les organismes de Beijerinck et de Van Delden ne sont pas les seules bactéries anaérobies capables de réduire les sulfates. Utilisant une technique dérivée de celle de Wilson, Blair et Maud, cet auteur a constaté que certaines souches de Clostridiales isolées à partir d'eaux douces et de boues de rivière sont douées de la même propriété. L'existence de ces micro-organismes en milieu marin est à rechercher.

La taxonomie des bactéries sulfato-réductrices a subi, depuis les découvertes de Beijerinck, d'importantes modifications. D'abord rattachées au genre *Spirillum*, puis au genre *Microspira* (Migula), elles sont considérées par Baars comme appartenant au genre *Vibrio* et c'est également sous cette dénomination qu'elles figurent dans l'ouvrage classique de Weinberg, Nativelle et Prévot (1937). Kluyver et Van Niel (1936) ont proposé de les réunir dans un genre spécial, le genre *Desulforibrio*. En 1938, Starkey a apporté une lumière nouvelle sur la phylogénie des bactéries sulfato-réductrices en démontrant qu'il s'agit d'orga-

nismes sporulés, caractère qui leur assigne une place à part dans la Systématique. La dénomination de *Sporovibrio*, proposée par Starkey, a été avalisée par Prévot (1940 a et b) et elle est celle qui nous paraît devoir être retenue, bien que la sixième édition du *Bergey's Manual* ait maintenu le genre *Desulfovibrio* et que ce nom générique soit encore le plus fréquemment usité dans les publications étrangères récentes.

Les techniques employées pour obtenir en cultures pures les bactéries sulfato-réductrices des sédiments marins sont, à quelques modifications près, celles de Van Delden (1904). Bastin (1926) a effectué ses études sur la flore des puits de pétrole de Californie avec un milieu liquide de Van Delden dont la composition était la suivante :

Phosphate dipotassique . . . . .	0,5 g.
Asparagine . . . . .	4
SO <sub>4</sub> Mg, 7 H <sub>2</sub> O. . . . .	2,5
Lactate de sodium . . . . .	5
Sel de Mohr . . . . .	Traces.
Eau . . . . .	1 litre.

Ce milieu peut être solidifié par adjonction d'agar et on procède en ce cas à des cultures en gélose profonde, suivant les techniques habituelles. Pour les ensemencements marins, on ajoute 30 g. par litre de chlorure de sodium.

Gall et Anderson (1928) insistent sur la nécessité de préparer le milieu de Van Delden avec de l'eau des conduites et non pas avec de l'eau distillée. Ils font en outre remarquer que le sulfite, préconisé par Van Delden pour renforcer le pouvoir réducteur du milieu et empêcher l'oxydation du fer ferreux durant la stérilisation, présente l'inconvénient de pouvoir être réduit à l'état de sulfure par des organismes autres que les bactéries sulfato-réductrices spécifiques.

Dans ses recherches sur les vases noires de la côte d'Afrique du Sud, Miss Judd (1934) a employé un milieu liquide de Baars ne contenant pas de sulfite et dans lequel la source d'azote n'est pas l'asparagine mais le chlorure d'ammonium, à la concentration de 1 g. par litre.

Les cultures d'enrichissement en milieu liquide peuvent être faites dans des vases d'Erlenmeyer, sans précautions d'anaérobiose spéciales, si ce n'est de remplir les récipients complètement et de les boucher, de façon à empêcher le renouvellement de l'air. La température d'incubation optima est de 25°-30° et le développement des bactéries se manifeste, au bout de trois à six jours, par l'apparition d'un précipité noir de sulfure de fer. Les colonies noires développées en gélose profonde ou les

milieux liquides sont repiqués à plusieurs reprises et on obtient finalement des cultures pures.

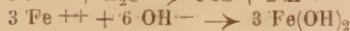
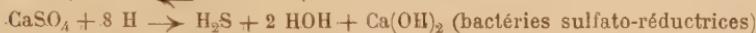
Les *Sporovibrio* manifestent une remarquable tolérance à l'égard de l'hydrogène sulfuré qu'ils libèrent dans les milieux de culture à des concentrations atteignant 0,3 à 0,5 g. par litre (Issatchenko, 1924). Cette particularité a été utilisée par Miss Judd (1934) pour l'obtention de cultures pures. Alors que les tentatives d'isolement par les procédés habituels étaient demeurées infructueuses, cet auteur a eu des résultats positifs constants en faisant des cultures primaires et des repiquages sur milieu liquide contenant 7,4 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>S N/10 par 100 cm<sup>3</sup>.

Dans les conditions naturelles, l'activité des bactéries sulfato-réductrices revêt une extrême importance. En particulier, c'est à la libération d'hydrogène sulfuré par ces micro-organismes que l'on doit attribuer l'absence de toute autre forme de vie animale ou végétale dans les eaux stagnantes de certains fjords norvégiens (Ström, 1939) et dans celles de la Mer Noire en-dessous de quelques centaines de mètres à partir de la surface. Copenhague (1934) a observé dans la baie sud-africaine de Walvis une mortalité périodique des poissons qui correspond à une libération saisonnière d'H<sub>2</sub>S par les vases noires du fond.

L'écologie de la flore sulfato-réductrice de la Caspienne et de la mer d'Azov a fait l'objet d'intéressantes études de la part de Butkevitch (1938). Cet auteur a constaté que la surface de la vase est normalement recouverte par une pellicule continue de bactéries sulfoxydantes, parmi lesquelles il a identifié *Beggiaea mirabilis* et des membres des genres *Thiophysa* et *Thiospira*. Ces bactéries réoxydent à l'état de sulfates l'hydrogène sulfuré formé dans la profondeur des sédiments par la flore sulfato-réductrice anaérobie. Lorsque la concentration en oxygène de l'eau avoisinant le fond devient trop faible, la pellicule protectrice disparaît et l'hydrogène sulfuré diffuse librement, ce qui entraîne la mort des animaux et des végétaux supérieurs.

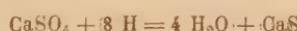
La production d'hydrogène sulfuré par réduction bactérienne des sulfates intervient dans d'autres phénomènes océanographiques, dont certains présentent un très grand intérêt théorique ou pratique. C'est le cas, notamment, de la corrosion du fer et de l'acier en contact avec l'eau ou les sédiments. Von Wolzogen Kühr et van der Vlugt (1934) ont établi l'existence et le mécanisme de ce type de corrosion anaérobie qui a récemment été constaté par Starkey et Schenone (1947) sur des surfaces métalliques immergées dans l'eau de mer. Suivant von Wolzogen Kühr, le processus de cette corrosion se ferait en plusieurs étapes. Le fer ferrique serait d'abord réduit électrolytiquement à l'état ferreux par les ions hydrogènes de l'eau. Puis l'hydrogène sulfuré provenant des sulfates précipiterait sous forme de sulfure une partie

de ce fer ferreux, dont les ions OH<sup>-</sup> transformeraient une autre partie en hydrate :

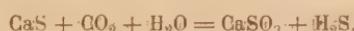


La réduction des sulfates est le seul terme bactérien de cette chaîne de réactions. Son rôle essentiel consiste dans l'utilisation et l'élimination de l'hydrogène produit par les phénomènes d'électrolyse ; sans cette catalyse bactérienne, la corrosion ne pourrait se produire en l'absence d'oxygène et en milieu neutre, car l'hydrogène s'accumulerait sur les surfaces cathodiques du métal et les dépolariserait rapidement (Starkey, 1947).

Ayant constaté la présence de bactéries sulfato-réductrices dans les fonds des Bahamas, Bavendamm (1932) a supposé que ces organismes peuvent contribuer à l'énorme précipitation calcique qui caractérise ces parages subtropicaux. Le mécanisme chimique présumé consistait dans la réduction du sulfate de calcium, grâce à l'hydrogène fourni par les matières organiques, et le déplacement concomitant par l'acide carbonique du sulfure de calcium produit :



et



En réalité, les acides organiques formés au cours de la fermentation anaérobiose et le fait que l'hydrogène sulfuré est lui-même légèrement acide semblent indiquer que l'activité des bactéries sulfato-réductrices agit plutôt dans le sens de la solubilisation du calcium que dans celui de sa précipitation (ZoBell, 1946). Il a été établi, d'autre part, que la précipitation calcique naturelle est liée à l'activité de la flore dénitritifante banale, ammonio-formatrice (Baier, 1937).

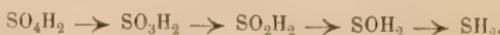
Si l'intervention des bactéries sulfato-réductrices marines dans la précipitation du calcium paraît devoir être écartée, il est établi, par contre, que ces micro-organismes jouent un rôle considérable dans cet autre phénomène géologique d'une grande importance qu'est la formation du pétrole. Cette question faisant l'objet du rapport de Prévot, on se contentera de rappeler ici la présence d'hydrocarbures dans les sédiments marins récents (Haas, 1943) et l'obtention d'hydrocarbures dans des cultures de *Sporovibrio*

d'origine marine sur des milieux contenant divers acides gras (Jankowski et ZoBell, 1944).

Rosenfeld (1948) a récemment apporté d'importantes précisions concernant l'action des anaérobies, et en particulier des anaérobies sulfato-réducteurs, sur les lipides des sédiments marins. L'analyse de l'extrait éthétré montre une diminution de l'indice d'iode et une augmentation du poids moléculaire moyen en fonction de la profondeur, c'est-à-dire de l'âge du sédiment. Ce fait peut s'expliquer par une consommation préférentielle des acides gras à chaîne courte et non saturée, ou par la réduction bactérienne des doubles liaisons, ou encore par une combinaison de ces deux facteurs, cette dernière hypothèse semblant être la plus vraisemblable. Inversement, les bactéries sulfato-réductrices sont capables, dans certaines conditions, d'oxyder anaérobiquement les acides gras et de les utiliser comme donneurs d'hydrogène pour accomplir la réduction des sulfates. Rosenfeld (1948) a constaté que, dans un même milieu, les réactions de réduction et d'oxydation anaérobies des acides gras peuvent se coupler. C'est ainsi qu'a été mis en évidence un système formique-linoléique, dans lequel l'acide formique est le donneur, et l'acide linoléique l'accepteur d'hydrogène.

La même complexité métabolique se retrouve dans le cas des hydrocarbures. Novelli et ZoBell (1944) ont signalé que les *Spororibrio* peuvent oxyder anaérobiquement les hydrocarbures à longue chaîne aliphatique, lorsque ces composés constituent la seule source de carbone présente. Ces observations ont été confirmées par Rosenfeld (1947) qui a montré que la décomposition oxydative des hydrocarbures détermine la formation transitoire d'acides gras et s'effectue par l'intervention d'une déhydrogénase.

En définitive, il ressort de ces données diverses que les bactéries sulfato-réductrices sont susceptibles d'accomplir, dans le milieu sédimentaire naturel, une grande variété de transformations chimiques à première vue contradictoires. Leur métabolisme essentiel paraît être la réduction des sulfates, conformément au schéma de Kluyver (1934) :



Dans ces quatre étapes successives, dont chacune comporte le transfert de deux atomes d'hydrogène, le donneur d'hydrogène est habituellement un composé organique qui est oxydé anaérobiquement par l'action d'une déhydrogénase. Mais les membres du genre *Spororibrio* sont également capables d'activer directement l'hydrogène moléculaire, grâce à une hydrogénase active (Stephenson et Stickland, 1931). Par ailleurs, lorsque les conditions nutritives sont modifiées, divers composés organiques peu-

vent remplacer les sulfates comme accepteurs d'hydrogène et être réduits anaérobiquement. Ce dernier cas semble, en particulier, être celui du processus de la formation des hydrocarbures à partir des acides gras. Butlin et Adams (1947) viennent, enfin, de montrer que la présence de composés organiques n'est pas absolument indispensable au développement des bactéries sulfato-réductrices et que ces organismes peuvent être adaptés progressivement à un mode de nutrition autotrophe, dans un milieu sulfaté, où les seules sources d'azote et de carbone sont le chlorure d'ammonium et le bicarbonate de soude.

Les différents modes de nutrition et d'activité des anaérobies sulfato-réducteurs semblent pouvoir s'exercer effectivement dans les sédiments marins, mais le sens dans lequel s'effectue l'activité protéiforme de ces organismes est déterminé par des facteurs dont la nature nous échappe encore. On ne sait pas, en particulier, quelles sont les conditions naturelles qui orientent le métabolisme des sulfato-réducteurs tantôt vers l'oxydation anaérobie des acides gras, tantôt vers la production d'hydrocarbures. Sans doute les rapides progrès de nos connaissances sur le métabolisme de ce groupe bactérien aboutiront-ils à jeter sur ces questions encore obscures une lumière nouvelle.

#### BACTÉRIES ANAÉROBIES CELLULOLYTIQUES ET AUTRES FERMENTATIONS ANAÉROBIES.

On ne possède encore que très peu de données sur la répartition, la nature et l'activité des bactéries cellulolytiques anaérobies dans les sédiments marins. Von Hoppe Seyler (1886) est le premier à avoir signalé la présence de ce groupe d'organismes dans la mer. Par la suite les anaérobies cellulolytiques ont été décelés par Van Iterson (1904) dans l'eau de mer, et par Issatchenko (1927) dans les eaux fortement salées du lac Tambukan. Dans ses cultures, Issatchenko a identifié le *Bacillus cellulosæ methanicus* d'Omelianski et a étudié le comportement de cette souche par rapport à la concentration du milieu en chlorure de sodium, mais n'a pas procédé à l'analyse des produits de la fermentation.

Les recherches de Waksman, Carey et Reuszer (1933) sur la décomposition de la cellulose par les bactéries marines concernent presque exclusivement la flore aérobie et la présence d'espèces anaérobies n'est mentionnée que de façon incidentelle dans le travail de ces auteurs.

Rubentschick (1928 et 1933) a effectué une étude plus complète sur les anaérobies cellulolytiques du Liman de Kujolnizki, étang saumâtre de la région côtière d'Odessa. Des ensemencements de vase noire ont été pratiqués sur milieu de Winogradsky contenant des morceaux de papier-filtre et des concentrations croissantes

de chlorure de sodium. La dégradation de la cellulose s'est manifestée jusqu'à une concentration saline de 15 p. 100 et s'est accompagnée d'un dégagement abondant de méthane, d'anhydride carbonique et d'hydrogène sulfuré. Parmi les nombreuses formes microbiennes présentes, se trouvait une bactérie incurvée, à spore terminale, qui a été identifiée comme une variété halotolérante de *Bacillus cellulosæ methanicus*, mais qui n'a pu être isolée en cultures pures.

La libération d'hydrogène sulfuré dans les cultures d'enrichissement est indépendante de la fermentation cellulolytique et résulte de la présence de bactéries sulfato-réductrices associées. Suivant Rubentschick, la dégradation de la cellulose par la flore anaérobiose spécifique favoriserait, dans les conditions naturelles, le développement de la flore sulfato-réductrice en lui fournissant des sources carbonées aisément assimilables. Cette association biochimique expliquerait l'exceptionnelle richesse en  $\text{H}_2\text{S}$  de la vase noire des Limans.

En ce qui concerne le dégagement de méthane observé par Rubentschick, on sait depuis les travaux de Clausen (1931) et de Meyer (1934) que ce gaz n'est pas produit, comme le croyait Omelianski, par l'activité des bactéries cellulolytiques anaérobies et que sa formation est due en réalité à la présence, dans les cultures d'enrichissement, d'une flore distincte et spécifique. La fermentation méthanique proprement dite a été observée dans les sédiments marins par Thayer (1931). Cherchant à démontrer la formation du pétrole par l'action des bactéries sur les lipides des diatomées, cet auteur a procédé à des ensemencements de vase marine dans des milieux contenant divers acides gras. Dans ces conditions expérimentales, il ne s'est pas formé d'hydrocarbures supérieurs, mais seulement du méthane. Thayer a nettement distingué cette fermentation méthanique de l'activité des sulfato-réducteurs et de la flore cellulolytique anaérobiose et l'a attribuée à une flore spécifique. Il a également montré que les acétates fournissent le substrat le plus favorable et que les germes en cause exigent des conditions d'anaérobiose très strictes, mais il n'a pu obtenir de cultures pures.

Par la suite, Barker (1937) a signalé que, lorsqu'on ensemence anaérobiquement de la vase marine sur un milieu contenant des sels minéraux, de l'alcool éthylique et du carbonate de soude, on obtient à la fois un dégagement abondant de méthane et la formation d'acides gras volatils. Des travaux récents ont démontré que les fermentations observées dans ces cultures d'enrichissement résultent de l'intervention de plusieurs organismes dont chacun est étroitement spécialisé. L'un de ces germes, *Methanobacterium omelianskii*, réduit l'anhydride carbonique à l'état de méthane, le donneur d'hydrogène étant soit un alcool primaire.

soit un alcool secondaire, lesquels sont transformés respectivement en acide ou en cétone correspondante. A cet agent spécifique de la fermentation méthanique est, en général, associée dans les vases marines une autre bactérie anaérobie qui a été isolée par Barker et Talha (1942) et individualisée sous le nom de *Clostridium kluyveri*. Ce dernier organisme ne forme pas de méthane, mais paraît avoir, dans les conditions naturelles, une activité complémentaire de celle du *Methanobacterium omelianskii*. Son développement nécessite la présence d'autolysat de levure, ou de biotine et d'acide para-amino-benzoïque, et, d'autre part, la présence simultanée d'alcool éthylique et d'un acide gras volatil, acétique, propionique ou butyrique (Bornstein et Barker, 1948). Le produit du métabolisme est la formation d'acides gras de poids moléculaire plus élevé.

A partir de vases marines, Cardon et Barker (1946) ont également isolé *Clostridium propionicum*, agent spécifique de la fermentation propionique, et *Diplococcus glycinophilus*, germe dont le métabolisme nécessite la présence de glycine.

L'isolement de ces bactéries, douées de pouvoirs fermentaires très étroitement spécialisés, présente un intérêt considérable et démontre, en particulier, la haute complexité des transformations de la matière organique dans les conditions naturelles. Il reste cependant à établir quelle est l'importance exacte du rôle que jouent ces organismes dans leur habitat océanique.

#### CONCLUSIONS.

Les sédiments marins constituent, du point de vue biologique, un milieu très comparable au sol terrestre, mais présentant toutefois quelques particularités importantes. C'est un milieu très réducteur, où prévalent des conditions fortement anaérobies. Sa composition chimique, en ce qui concerne la matière organique, est encore mal connue, mais ne paraît pas très différente de celle de l'humus terrestre. Par contre, il est à souligner que les dépôts océaniques sont soumis à des conditions de température, de salinité et d'hydratation beaucoup plus constantes que celles du sol.

Dans ce milieu naturel, s'accomplissent des fermentations anaérobies analogues à celles qui ont été observées dans le sol : fixation de l'azote gazeux, réduction des sulfates, dégradation de la cellulose, fermentation méthanique, lipolyse. Certains de ces processus bactériologiques sont susceptibles de revêtir une grande importance pratique, en particulier du fait de leurs rapports avec la fertilité des mers, la formation du pétrole et la corrosion des structures métalliques. En fait, nos connaissances sur le rôle des bactéries anaérobies dans ces phénomènes naturels sont encore très fragmentaires et laissent bien des points dans l'ombre. Les

espèces anaérobies qui ont été isolées à partir des sédiments marins sont extrêmement peu nombreuses ainsi que le montre la liste suivante, établie suivant la nomenclature de la deuxième édition (1948) du *Manuel de Classification* de Prévot :

*Caduceus cellulosæ hydrogenicus*, *Caduceus cellulosæ méthanicus* (syn. *Methanobacterium omelianskii*, Barker), *Clostridium giganteum* (Benecke et Keutner), *Clostridium pastorianum* (Benecke et Keutner), *Diplococcus glycinophilus* (Cardon et Barker), *Endosporus (Clostridium) propionicus* (Cardon et Barker), *Sporovibrio desulfuricans* var. *aestuari* (Van Delden), *Terminosporus (Clostridium) kluyveri* (Barker et Taha).

Il est vraisemblable qu'une étude d'ensemble de la flore anaérobie et l'isolement systématique des souches rencontrées au cours des numérotations conduiront à compléter et à allonger considérablement cette liste encore très succincte.

#### BIBLIOGRAPHIE

BAARS (J. K.). *Over Sulfaatreduceertie door Bacterien*, Thèse, Delft, 1930.

BAËR (C. R.). *Geol. d. Meere u. Binnengewässer*, 1937, **1**, 75-105.

BARKER (H. A.). *Arch. Mikrobiol.*, 1937, **8**, 415-421.

BARKER (H. A.) et TABA (S. M.). *J. Bact.*, 1942, **43**, 347-363.

BASTIN (E. S.). *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geol.*, 1926, **10**, 1270-1299.

BAVENDAMM (W.). *Arch. f. Mikrobiol.*, 1932, **3**, 205-276.

BEIJERINCK (M. W.). *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 1895, **1**, 1-9 ; 49-59 ; 104-114.

BENECKE (W.) et KEUTNER (J.). *Ber. Deut. Botan. Ges.*, 1903, **21**, 333-345.

BORNSTEIN (B. T.) et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1948, **55**, 223-230.

BOYSEN-JENSEN (B.). *Rept. Danish Biol. Sta.*, 1914, **22**, 5-39.

BRAND (von T.), RAKESTRAW (N. W.) et ZABOR (J. W.). *Biol. Bull.*, 1942, **83**, 273-282.

BRUJEVICZ (B. W.). *C. R. Acad. Sci. U.R.S.S.*, 1938, **19**, 637-640.

BUTKIEWITCH (V. S.). *Mikrobiologia*, 1938, **7**, 1005-1021.

BUTLIN (K. R.) et ADAMS (M. E.). *Nature*, 1947, **160**, 154.

CARDON et BARKER (H. A.). *J. Bact.*, 1946, **52**, 629.

CERTES (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1884, **98**, 690-693.

CLAUSEN (P.). *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 1931, **84**, 20.

COPENHAGEN (W. J.). *Union South Africa Fish. Mar. Biol. Survey Report*, 1933, n° 3, 3-18.

EMERY (K. O.) et DIETZ (R. S.). *Bull. Geol. Soc. Amer.*, 1941, **52**, 1685-1714.

FISCHÈRE (B.). *Centralbl. Bakt.*, 1894, **15**, 657-666.

GAHL (R.) et ANDERSON (B.). *Centralbl. Bakt.*, II. abt., 1928, **73**, 331-338.

GINSBURG-KARAGITSCHEVA (T. L.). *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geol.*, 1933, **17**, 52-65.

HAAS. Résultats inédits cités dans l'article de ZoBell 1943, *Petrol. World*, 1943, **40**, 30-43.

HOPPE-SEYLER (von). *Zeitschr. Physiol. Chem.*, 1886, **10**, 401.

ISSATCHENKO (B. L.). *C. R. Acad. Sci.*, 1924, **178**, 2204-2206.

ISSATCHENKO (B. L.). *Mikrobiologische Untersuchungen von Schlammseen*, Leningrad, 1927, 121 p.

ISSATCHENKO (B. L.). *Mikrobiologija, U.R.S.S.*, 1946, **15**, 486-490.

JUDD (M.). *Union South Africa Fish. Mar. Biol. Survey Report*, 1934, n° 11, 12-14.

JANKOWSKI (G. J.) et ZOBELL (C. E.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 447.

KEUTNER (J.). *Wiss. Meersunters, Abt. Kiel, N. F.*, 1905, **8**, 27-55.

KLUYVER (A. J.). *The chemical activities of microorganisms*, Londres, 1934.

KREPS (E.). *James Johnston Memorial Volume*, Liverpool Univ. Press., 1934, 193-202.

MEYER (R.). *Arch. Mikrobiol.*, 1934, **5**, 185-222.

MURRAY (J.) et IRVINE (R.). *Trans. Roy. Soc. Edinburgh*, 1895, **37**, 481-508.

NOVELLI (G. D.) et ZOBELL (C. E.). *J. Bact.*, 1944, **47**, 447-448.

PETTERSSON (H.). *Nature*, 1947, **160**, 559-560 ; *ibid.*, 1948, **162**, 324-325.

PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 1940, **64**, 117-126.

PRÉVOT (A.-R.). *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies*, Paris, 1940, 213 p. ; 2<sup>e</sup> éd. Paris, 1948, 287 p.

PRÉVOT (A.-R.). *Ces Annales*, 1948, **75**, 571-574.

RITTENBERG (S. C.). *J. Mar. Res.*, 1940, **3**, 191-201.

RITTENBERG (S. C.), ANDERSON (D. Q.) et ZOBELL (C. E.). *Proceed. Soc. exp. Biol. a. Med.*, 1937, **35**, 652-653.

ROSENFELD (W. D.). *Thèse*, University of California, 1947.

ROSENFELD (W. D.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 664-665.

ROSENFELD (W. D.). *Arch. Biochem.*, 1948, **16**, 263-273.

RUBENTSCHICK (L.). *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 1928, **76**, 305-314.

RUBENTSCHICK (L.). *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 1933, **88**, 182-186.

RUSSELL (H. L.). *Botan. Gaz.*, 1892, **47**, 312-321.

SCHOKALSKY (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1928, **186**, 1707-1709.

STARKEY (R. L.). *Arch. Mikrobiol.*, 1938, **9**, 268-304.

STARKEY (R. L.). *Antonie van Leeuwenhoek*, 1947, **12**, 193-203.

STARKEY (R. L.) et SCHENONE (J. D.). *J. Bact.*, 1947, **54**, 46.

STEPHENSON (M.) et STICKLAND (L. H.). *Biochem. J.*, 1931, **25**, 215-220.

STRÖM (K. M.). « Recent marine sediments ». *Am. Assoc. Petrol. Geol.* Tulsa, Oklahoma, 1939, 356-372.

THAYER (L. A.). *Bull. Am. Petrol. Geol.*, 1931, **15**, 441-453.

TRASK (P. D.). « Recent marine sediments ». *Am. Assoc. Petrol. Geol.* Tulsa, Oklahoma, 1939, 428-453.

VAN DELDEN (A.). *Centralbl. Bakt.*, II Abt., II, 1904, 81-94 et 113-119.

VAN ITERSON. *Centralbl. Bakt.*, II Abt., 1904, **2**, 689.

WAKSMAN (S. A.). *Soil Sci.*, 1933, **36**, 125-147.

WAKSMAN (S. A.), CAREY (C.) et REUSZER (H. W.). *Biol. Bull.*, 1933, **65**, 57-79.

WAKSMAN (S. A.), HOTCHKISS (M.) et CAREY (C.). *Biol. Bull.*, 1933, **65**, 137-167.

WEINBERG (M.), NATIVELLE (R.) et PRÉVOT (A.-R.). *Les microbes anaérobies*, Paris, 1937.

WHIPPLE (G. C.). *Tech. Quart.*, 1901, **14**, 21-29.

WOLZOGEN-KÜHR (von C. A. H.) et VAN DER VLUKT (L. S.). *Water*, 1934, **18**, 147.

ZELINSKI (N. D.). *Proceed. Russ. Phys. Chem. Soc.*, 1893, **25**, 298-303.

ZOBELL (C. E.). *J. Sediment. Petrology*, 1938, **8**, 10-18.

ZOBELL (C. E.). « Recent marine sediments ». *Am. Assoc. Petrol. Geol.* Tulsa, Oklahoma, 1939, 416-427.

ZOBELL (C. E.). *Marine Microbiology*, Waltham, Mass. U.S.A., 1946, 240 p.

ZOBELL (C. E.) et ANDERSON (D. Q.). *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geol.*, 1936, **20**, 258-269.

ZOBELL (C. E.) et UPHAM (H. C.). *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, 1944, **5**, 239-292.



PHOTOMICROGRAPHIES EN FLUORESCENCE DE FIBRES DE LIN  
IMPREGNEES PAR LA THIOFLAVINE. (Gross. :  $\times 800$ .)

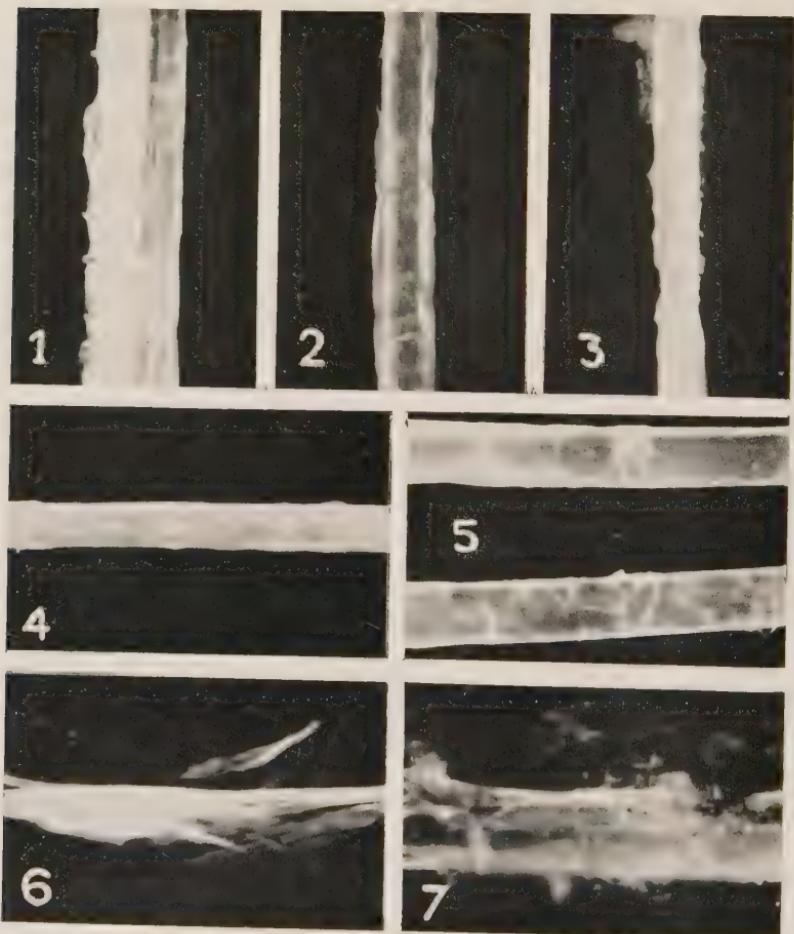


FIG. 1. — Fibre non rouie non lavée.

FIG. 2. — Fibre non rouie mais lavée.

FIG. 3. — Fibre rouie non lavée.

FIG. 4. — Fibre rouie et lavée (commerciale).

FIG. 5. — Fibre rouie et lavée (*Cl. corallinum*).

FIG. 6. — Fibre soumise à l'action des cellulolytiques aérobies (thioflavine).

FIG. 7. — Fibre soumise à l'action des cellulolytiques aérobies  
(Orangé d'acridine).

INFLUENCE DU DÉVELOPPEMENT  
DES BACTÉRIES  
PECTINOLYTIQUES OU CELLULOLYTIQUES  
SUR L'ASPECT MICROSCOPIQUE  
DES FIBRES DE CELLULOSE

par JEAN C. LEVADITI.

(*Institut Pasteur. Service de M. P. LÉPINE.*)

Au cours du rouissage, l'attaque des pectines par les bactéries permet la libération des fibres de lin qu'elles englobent et leur séparation d'avec les autres éléments qui constituent la tige du lin. Au contraire, sous l'influence des bactéries cellulolytiques il y a une attaque de la fibre elle-même qui aboutit à sa désintégration.

La microscopie en fluorescence [1, 2] permet d'observer et de photographier les fibres de cellulose, la pectine et les bactéries d'un point de vue différent de celui de la microscopie en lumière blanche [3], grâce à leur lumière de fluorescence primaire ou propre, ou à la fluorescence secondaire que leur confèrent les fluorochromes.

I. — ACTION DES BACTÉRIES PECTINOLYTIQUES.

Le rouissage du lin, par les cultures pures de bactéries anaérobies, a permis de reconnaître l'efficacité des germes pectinolytiques, type *Clostridium corallinum* et l'absence de rouissage par des germes non pectinolytiques, type *Clostridium sporogenes* [4].

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE. — Les tiges de lin, soumises ou non à un rouissage préalable, sont écrasées et dissociées mécaniquement dans le sens de leur longueur de façon à séparer et à isoler les fibres de lin. Ces fibres sont ensuite coupées et sont, soit déposées directement dans une chambre en quartz d'une dizaine de  $\mu$  de profondeur qui les immobilise sensiblement dans un même plan, soit soumises à l'action de la thioflavine S, en solution à

2 p. 1.000, pendant une minute, puis lavées et séchées, avant d'être introduites dans la chambre en quartz (1).

Dans des préparations successives nous avons fait varier la méthode de rouissage et l'avons fait suivre ou non de la dissociation mécanique et du lavage des fibres de façon à faire la part de chacune de ces opérations.

Cependant, dans chaque préparation, il y a, d'une fibre à l'autre, des variations individuelles de structure : fibres souples, dénudées, isolées et fibres rigides, enveloppées de leur gangue, et réunies en faisceaux. Nous avons donc photographié les formes les plus typiques et les plus souvent rencontrées dans chaque préparation.

**RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.** — *Fibres de lin non soumises au rouissage, simplement dissociées mécaniquement* (fig. 1). — Elles sont constituées par de longs filaments tubulaires, rectilignes, creux, cloisonnés transversalement et doués d'une fluorescence propre bleuâtre. A leur surface il est possible de distinguer des dépôts protopectiques formant une gangue irrégulière dont la lumière de fluorescence est rougeâtre.

*Fibres de lin non soumises au rouissage mais broyées et lavées à l'eau courante* (fig. 2). — Ces fibres sont en tous points analogues aux précédentes, elles sont également entourées de débris épidermiques.

*Fibres de lin rouies à l'aide de cultures pures de *Cl. corallinum*, non lavées* (fig. 3). Ces fibres sont identiques aux précédentes, elles sont également englobées par une gaine de matière inorganisée, irrégulièrement disposée. Sur les échantillons examinés, desséchés depuis plusieurs mois, seuls des spores ou des corps bactériens ne prenent plus le Gram persistaient au niveau de la gaine pectinique, à l'examen en lumière blanche.

*Fibres de lin soumises soit au rouissage empirique, soit au rouissage par culture pure de *Cl. corallinum*, puis broyées et lavées à l'eau courante* (fig. 4 et 5). — Les fibres proprement dites ont toujours le même aspect mais elles sont libérées de leur gangue pectinique. Seules quelques rares écailles persistent à leur surface formant soit des irrégularités sur le bord de la fibre, soit des plaques irrégulières visibles par transparence. Des stries obliques ou transversales, déjà observées par Frey-Wissling [5], ont une apparence bactérienne mais leur signification est discutable.

(1) Nous remercions très vivement MM. A.-R. Prévot, M. Raynaud et J. Pochon des conseils et du matériel dont ils ont bien voulu nous faire bénéficier.

*Fibres de lin soumises à l'action de *Cl. sporogenes*, germe non pectinolytique, puis broyées et lavées à l'eau courante.* — L'aspect en fluorescence est le même que celui des fibres non rouies. La pectine n'a pas été entraînée par l'eau courante et ses débris restent adhérents à la paroi. Malgré la pullulation bactérienne l'absence de pectinolyse ne permet pas de libérer la fibre qui reste rigide et se rompt facilement.

## II. — ACTION DES GERMES CELLULOLYTIQUES.

La cellulose peut être attaquée par les germes cellulolytiques soit en aérobiose [6], soit en anaérobiose [7]. La microscopie en fluorescence permet d'étudier l'aspect des fibres de cellulose soumises à l'action des germes cellulolytiques en renforçant leur fluorescence propre, soit par la thioflavine S qui colore électivement les fibres, soit par l'orangé d'acridine en solution aqueuse à 2 p. 1.000. Après action de l'orangé d'acridine il est possible d'observer les fibres grâce à leur fluorescence jaune verdâtre très intense et les germes grâce à leur fluorescence rouge orangé.

Sur les préparations microscopiques (fig. 6 et 7), les bactéries sont visibles au voisinage des fibres et au contact de leur surface. Quelques fibres ont conservé leur aspect primitif mais leurs détails de structure sont plus estompés que ceux des fibres normales. La plupart des fibres sont désagrégées en fragments linéaires inégaux qui se rompent au moindre choc.

Ces images de rupture semblent provenir des traumatismes produits au cours des étalements, ce qui confirme que les fibres de cellulose primitives ont perdu leur cohésion et leur élasticité normales.

## CONCLUSIONS.

La microscopie, et particulièrement la microscopie en fluorescence, des fibres de lin confirmé que les bactéries anaérobies, telles que *Cl. corallinum*, attaquent la pectine dont les restes se séparent aisément de la fibre lorsqu'elle est broyée et lavée. Ni le rouissage seul, ni le broyage et le lavage seuls ne permettent de dénuder complètement la fibre ; les deux opérations sont indispensables.

Une bactérie pectinolytique, telle *Cl. sporogenes*, ne peut être utilisée pour le rouissage et, malgré le broyage et le lavage, il est impossible d'isoler les fibres de lin de leur gangue pectinique.

Les bactéries aérobies cellulolytiques attaquent la fibre de cellulose et la désagrègent en fibres ou en faisceau de fibres élémentaires très fragiles.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] HAITINGER (M.). *Z. Wiss. Mikroskopie*, 1933, **50**, 195 ; *Photogr. u. Forsch.*, 1937, **1**, 2.
- [2] LEVADITI (J.-C.). *La Biologie médicale*, 1946, **35**, 33.
- [3] PRÉVOT (A.-R.) et RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1946, **222**, 1531  
RAYNAUD (M.). *Les anaérobies pectinolytiques*. Rapport au II<sup>e</sup> Congrès International de l'Association des Microbiologistes de Langue Française, Bruxelles, 1949.
- [4] SZYMANEK (J.). *Bull. Inst. Textile de France*, septembre et décembre 1948.
- [5] FREY-WISSLING (A.). *Helvetica Chimica Acta*, 1936, **19**, 901.
- [6] HARMSEN (G. W.). *Onderzoeken over de aërobe celluloseontleding in den grond*, Groningen, éditeurs, Holland, 1946.
- [7] POCHON (J.). *Les anaérobies cellulolytiques*. Rapport au II<sup>e</sup> Congrès International de l'Association des Microbiologistes de Langue Française, Bruxelles, 1949.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*